

FACULTE DE MEDECINE DE PARIS

573

Année 1959

N°

THESE POUR LE DOCTORAT

EN MEDECINE

(Diplôme d'Etat)

PAR

PHILBERT, Michel, Jean, Philippe

né le 25 septembre 1929, à Charleville
(Ardennes)

Présentée et soutenue publiquement

le

1959

LES 17-HYDROXYCORTICOSTEROIDES PLASMATIQUES

(HYDROCORTISONE ESSENTIELLEMENT)

ET LEUR DOSAGE CHIMIQUE

Président. : M.F. JAYLE, Professeur

1959

FACULTE DE MEDECINE DE PARIS

Année 1959

N°

THESE POUR LE DOCTORAT
EN MEDECINE

—
(Diplôme d'Etat)

PAR

PHILBERT, Michel, Jean, Philippe
né le 25 septembre 1929, à Charleville
(Ardennes)

—
Présentée et soutenue publiquement

le

1959

—
LES 17-HYDROXYCORTICOSTEROIDES PLASMATIQUES
(HYDROCORTISONE ESSENTIELLEMENT)
ET LEUR DOSAGE CHIMIQUE

—
Président : M.F. JAYLE, Professeur





PROFESSEURS HONORAIRES

MM. AUBIN (A), BENARD (H), BROCC (P), BULLIARD (H), CADENAT (F),
CHABROL (E), CHAMPY (C), CHEVALLIER (P), DEBRE (R), DONZELOT (E),
GASTINEL (P), GUILLAIN (G), HALPHEN (E), HARVIER (P) HAZARD (R),
HEUYER (G), LANTUEJOUL (P), LAROCHE (G), LAUBRY (C), LEVY-SOLL (E)
LHERMITTE (J), LIAN (C), LOEPER (M), MARION (G), MATHIOT (P),
MOCQUOT (P), MONDOR (H), MONOD (R), MOREAU (R), MULON (P), OLIVIER (E)
RICHEL (C), STROHL (A), TANON (L), VELTER (E).

DOYEN : Léon BINET, Membre de l'Institut

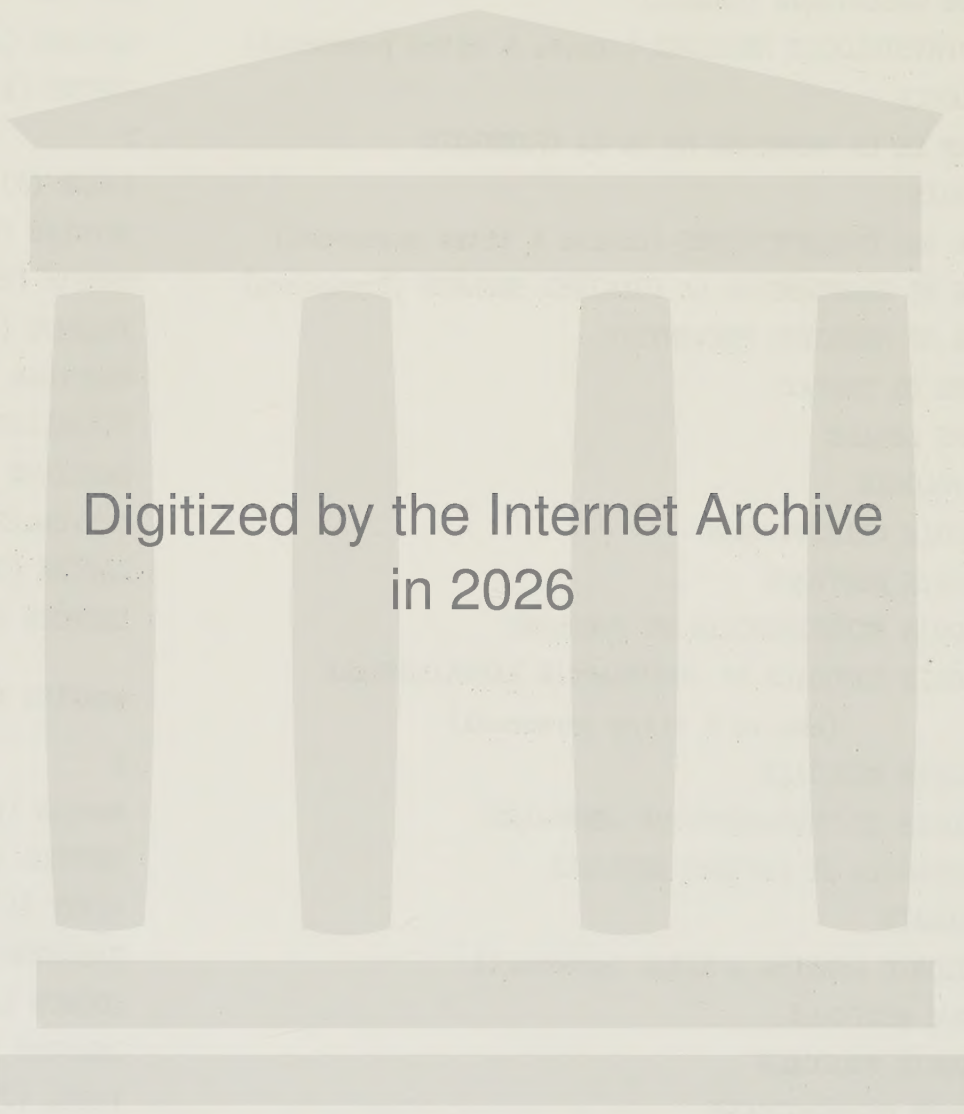
ASSEESSEUR : Jean VERNE

ANATOMIE	CORDIER (G.)
ANATOMIE (Chaire à titre personnel)	DELMAS (A.)
ANATOMIE PATHOLOGIQUE	DELARUE (J.)
ANESTHESIOLOGIE	BAUMANN (J.)
BACTERIOLOGIE	FASQUELLE (R.)
BIOCHIMIE MEDICALE	JAYLE (M.F.)
BIOLOGIE APPLIQUEE A L'EDUCATION PHYSIQUE et aux Sports	CHAILLEY-BERT
BIOLOGIE MEDICALE	FAUVERT (R.)
CANCEROLOGIE MEDICALE ET SOCIALE	BERNARD (J.)
CLINIQUE CARCINOLOGIQUE (Inst. G. Roussy)	REDON (H.)
CLINIQUE CARDIOLOGIQUE (Broussais)	MOUQUIN
(Beaujon	SICARD (A)
(Cochin	QUENU (J)
CLINIQUES CHIRURGICALES (Hotel Dieu	MENEGAUX (G)
(Saint Antoine	GOSSET (J)
(Salpêtrière	MOULONGUET (P)
CLINIQUE DE CHIRURGIE INFANTILE ET ORTHOPEDIQUE (Enf. Malades)	FEVRE (

CLINIQUE chirurgicale orthopedique et reparatrice (Cochin)	MERLE D'AUBIGNE (R)
CLINIQUE DE CHIRURGIE CARDIO-VASCULAIRE (Broussais)	GAUDART d'ALLAINES (F.de)
CLINIQUE DE CHIRURGIE PLEURO-PULMONAIRE (Laënnec)	MATHEY (J)
CLINIQUE ENDOCRINOLOGIQUE (Pitié)	DECOURT (J)
CLINIQUE GENETIQUE MEDICALE (Enfants Malades)	LAMY (M)
CLINIQUE GYNECOLOGIQUE (Broca)	FUNCK-BRENTANO (P)
CLINIQUE DES MALADIES CUTANÉES ET SYPHILITQUES (St Louis)	DEGOS (R)
CLINIQUE DES MALADIES DES ENFANTS (Enfants Malades)	CATHALA (J)
CLINIQUE DES MALADIES INFECTIEUSES (Claude-Bernard)	MOLLARET (P)
CLINIQUE DES MALADIES MENTALES ET DE L'ENCEPHALE (Ste Anne)	DELAY (J)
CLINIQUE DES MALADIES METABOLIQUES (Necker)	HAMBURGER (J)
CLINIQUE DES MALADIES DU SANG (Broussais)	MARCHAL (G)
CLINIQUE DES MALADIES DU SYSTEME NERVEUX (Salpêtrière)	ALAJOUANINE (T)
	GENNES (L. de)
	JUSTIN-BESANÇON
	BARIETY (M)
CLINIQUES MEDICALES	SOULIE (P)
	DREYFUS (G)
	KOURILSKY (R)
CLINIQUE MEDICALE D'HYDROLOGIE THERAPEUTIQUE	
ET CLIMATOLOGIE (Bichat)	DEBRAY (C)
CLINIQUE MEDICALE PROPEDEUTIQUE	PASTEUR VALLERY-RADOT (L)
CLINIQUE MEDICO-SOCIALE DU DIABETE SUCRE ET DES MALADIES	
DE LA NUTRITION (Hotel Dieu)	DEROT (M)
CLINIQUE DE NEURO-CHIRURGIE (Pitié)	PETIT-DUTAILLIS (D)
(Baudelocque)	LACOMME (M)
CLINIQUES OBSTETRIQUES (Port-Royal)	N
(Tarnier)	VARANGOT (J)
CLINIQUE OPHTALMOLOGIQUE (Hotel-Dieu)	RENARD (G)
CLINIQUE OTO-RHINO-LARYNGOLOGIQUE (Lariboisière)	AUBRY (M)
CLINIQUE DE PEDIATRIE SOCIALE (Enfants Malades)	MARIE (J)
CLINIQUE DE PNEUMO-PHTISIOLOGIE (Laënnec)	BERNARD (E.)
CLINIQUE PSYCHIATRIQUE INFANTILE (Salpêtrière)	MICHAUX (L)
CLINIQUE DE PUERICULTURE (St Vincent de Paul)	LELONG (M)

CLINIQUE DE RHUMATOLOGIE MEDICALE ET SOCIALE (Cochin)	COSTE (F)
CLINIQUE STOMATOLOGIQUE (Pitié)	DECHAUME (M)
CLINIQUE THERAPEUTIQUE CHIRURGICALE (Vaugirard)	SENEQUE (J)
CLINIQUE THERAPEUTIQUE MEDICALE (St Antoine)	LEMAIRE (A)
CLINIQUE UROLOGIQUE (Cochin)	FEY (B)
ELECTROPHYSIOLOGIE MEDICALE (chaire à titre personnel)	DJOURNO (A)
EMBRYOLOGIE	GIROUD (A)
HISTOIRE DE LA MEDECINE ET DE LA CHIRURGIE	N
HISTOLOGIE	VERNE (J)
HYGIENE DES COLLECTIVITES (chaire à titre personnel)	DEPARIS (M)
HYGIENE ET CLINIQUE DE LA PREMIERE ENFANCE (Trousseau)	TURPIN (R)
HYGIENE ET MEDECINE PREVENTIVE	JOANNON (P)
MEDECINE DU TRAVAIL	DESOILLE (H)
MEDECINE LEGALE	PIEDELIEVRE (R)
PARASITOLOGIE	GALLIARD (H)
PATHOLOGIE CHIRURGICALE	COUVELAIRE (R)
PATHOLOGIE EXOTIQUE	LAVIER (G)
PATHOLOGIE EXPERIMENTALE ET COMPAREE	LENEGRE (J)
PATHOLOGIE HUMORALE ET IMMUNOLOGIE EXPERIMENTALE (chaire à titre personnel)	MERKLEN (F.P.)
PATHOLOGIE MEDICALE	N
PATHOLOGIE ET THERAPEUTIQUE GENERALES	GARCIN (R)
PHARMACOLOGIE ET MATIERE MEDICALE	CHEYMOL (J)
PHYSIOLOGIE	BINET (L)
PHYSIOLOGIE (chaire à titre personnel)	BARGETON (D)
PHYSIQUE MEDICALE	DOGNON (A)
RADIOLOGIE MEDICALE	DESGREZ (H)
TECHNIQUE CHIRURGICALE	PATEL (J)
THERAPEUTIQUE	BROUET (G)





Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41556009_0022

II - PROFESSEURS SANS CHAIRE, PROFESSEURS AGREGES

ET MAITRES DE CONFERENCES-AGREGES

Anatomie :	(CABROL (C) (COUINAUD (C) (OLIVIER (G)	Orthopédie :	JUDET (R) RAMADIER (J)
Anatomie pathologique :	(GAUTHIER-VILLARS (Melle P) (pr. s. ch. (BUSSE (F) (GOUYGOU (Ch) (ORCEL (L) (PAILLAS (J)	Oto-Rhino-Laryngologie :	DEBAIN (J)
Anesthésiologie :	VOURC'H (G)	Parasitologie :	(BRUMPT (L.C) (p. s. ch. (CHABAUD (A)
Bactériologie :	(NEVOT (A) pr.s. ch. (BARBIER (P) (CHRISTOL (D) (TCUERNIER (P)	Pathologie chirurgicale :	(BARCAT (J) (BINET (J.P) (CAUCHOIX (J) (CHATELIN (C.L) (DUBOST (Ch) (DUBOST (Cl) (FAUREL (J) (FLABEAU (F) (GERMAIN (A) (LAURENCE (G) (agr. per. (LORTAT-JACOB (J.L) (LOYGUE (J) (MERCADIER (PERROTIN (J) (ROBERT (H) (THOMERET (G)
Biochimie médicale :	(DESGREZ (P) Pr.s.ch. (POLONOSKI (J) m.conf. (SCHAPIRA (G) m. conf.		
Biologie médicale :	BOURLIERE (F) m. conf.		
Carcinologie :	(DENOIX (P) (MATHE (G)		
Dermato-Syphiligraphie :	DUPERRAT (B)	Pathologie exotique :	SCHNEIDER (J)
Electro-Radiologie :	LEDOUX-LEBARD		(CROSNIER (J) (HARTMANN (L)
Embryologie :	TUCHMANN-DUPLESSIS (H)	Pathologie expérimentale	(LOEPER (J) (MAURICE (J) (PLAS (F) (RICHEL (G)
Hématologie :	(BILSKI-PASQUIER (G) (DAUSSET (J)		
Histologie :	(COUJARD (R) (pr.s. ch.) (MAROIS (M) (RACADOT (J)		
Hydrologie :	CORNET (A)		

Hygiène :	(BOYER (J) (Pr. s. ch. (CORRE-HURST (Mme L)	(AUSSANNAIRE (M) (BOUR (H) (BOUVIER (J) (BOUVRAIN (Y) (BRICAIRE (H) (BRISSAUD (H) (BROCARD (H) (BUGE (A) (CASTAIGNE (P) (M; Conf. (CATINAT (J) (CONTAMIN (F) (COURY (C) (FREZAL (J) (HOUSSET (E.) (LAROCHE (Cl) (LESOBRE (R) (MACREZ (C) (NICK (J) (PEQUIGNOT (H) (M. conf. (ROYER (P) (WOLFROMM (R)
Maladies infectieuses :	(BASTIN (R) (DUPONT (V) (DEROBERT (L) (P. s. ch. (HADENGUE (A) (FOURNIER (E) (GUENIOT (M)	
Médecine légale :		Pathologie médicale :
Médecine du travail :	ALBAHARY (C)	
Neuro-chirurgie :	DAVID (M)	
Neurologie :	LHERMITTE (F) (GRANJON (A) (HERVET (E) (LE LORIER (G) (MORIN (P) (MUSSET (R) (ROBEY (M) (THOYER-ROZAT (J)	
Obstétrique :		Pneumo-phtisiologie : KREIS (B)
	(BREGEAT (P) (SARAUX (H)	Psychiatrie : PICHOT (P)
Ophtalmologie :		Psychiatrie infantile : DUCHE (D)
	(JOSEPH (R) (MANDE (R) (MOZZICONACCI (P) (POLONOVSKI (C) (ROSSIER (A)	Rhumatologie : DELBARRE (F)
Pédiatrie-Puériculture :		
	(LEVY (Melle J) (pr. s. ch. (BOISSIER (J) (LECHAT (P)	Stomatologie : (CERNEA (P) (CHAPUT (Mme A) (m.c. agr. (GRELLET (M)
Pharmacologie :		Thérapeutique : (CHASSAGNE (P) (LAMOTTE (M)
	(PARROT (J) (pr. s. ch. (DEJOURS (P)	
Physiologie :		Urologie : QUENU (L)
Physique Médicale :	GOUGEROT (L) m. conf.	

PROFESSEURS SANS CHAIRE ET AGREGES

CHARGES DE COURS DE CLINIQUE ANNEXE

à titre permanent

Clinique chirurgicale :	(ABOULKER (P))	Clinique	SEZE (S.de)
	(AMELINE (A))	neuro-rhumatologique :	
	(HUGUIER (J))		
	(LEGER (L))		
	(OLIVIER (C))		(GRASSET (J))
	(PADOVANI (P))		(LEPAGE (F))
Clinique médicale :	(POILLEUX (F))	Clinique obstétricale :	(MAYER (M))
	(ROUX (M))		(MERGER (R))
	(VERNE (J.M))		(RAVINA (J))
	(HAGUENEAU (J))	Clinique ophtalmologique :	(DESVIGNES (P))
	(Pr. s. ch.		(OFFRET (G))
	(BOUDIN (E))		
	(CONTE (M))	Clinique	
	(DOMART (A))	oto-rhino-laryngologique	MADURO (R)
	(MILLIEZ (P))		
	(PERRAULT (M))	Clinique	
	(RAMBERT (P))	pédiatrique et puériculture	LAPLANE (R)
	(THIEFFRY (S))		
	(TURIAF (J))	Clinique psychiatrique :	BARUK (H)
		Clinique urologique :	KUSS (R)

PROFESSEURS DETACHES
DANS LES UNIVERSITES ETRANGERES

Bactériologie :	HAUDUROY (P), Pr. s. ch.
Biochimie médicale :	ETTORI (J) Pr. à t. pers.
Pathologie chirurgicale :	RUDLER (J) Pr. s. ch.

Secrétaire général de la Faculté : LENA (J.)
 Secrétaïres : Mme BEURLAND (H), Mlle CHAINTREUIL (G), Melle HURE (A)
 Conservateur, chargé de la direction de la Bibliothèque : M. le Docteur HAHN (A)
 Conservateurs : Melles DUMAITRE (P), GOICHON (A.M.)
 Bibliothécaires : Mme CONTET (J), Melles LAURENT (H), LE NOIR (G), QUIEVREUX (E).

Nom : PHILBERT, Michel, Jean, Philippe

Date de naissance : 25 septembre 1929

Thèse N° , soutenue le

Nom : PHILBERT Michel, Jean, Philippe

LES I7-HYDROXYCORTICOSTEROIDES
PLASMATIQUES (Hydrocortisone essen-
tiellement) ET LEUR DOSAGE CHIMIQUE
Thèse Paris 1959, ronéotypée, 162 p.

Nom : PHILBERT Michel, Jean, Philippe

LES I7-HYDROXYCORTICOSTEROIDES PLASMA-
TIQUES (Hydrocortisone essentiellement)
ET LEUR DOSAGE CHIMIQUE
Thèse Paris 1959, ronéotypée, 162 p.

Nom : PHILBERT Michel, Jean, Philippe

LES I7-HYDROXYCORTICOSTEROIDES
PLASMATIQUES (Hydrocortisone essen-
tiellement) ET LEUR DOSAGE CHIMIQUE
Thèse Paris 1959, ronéotypée 162 p.

Nom : PHILBERT Michel, Jean, Philippe

LES I7-HYDROXYCORTICOSTEROIDES PLASMA-
TIQUES (Hydrocortisone essentiellement)
ET LEUR DOSAGE CHIMIQUE
Thèse Paris 1959, ronéotypée, 162 p;

A MA MERE ET A MA FIANCEE.

A MON PERE.

AUX MIENS.

A NOTRE MAITRE,

MONSIEUR LE PROFESSEUR M.F. JAYLE,

Professeur de la chaire de Biochimie Médicale,

Officier de la Légion d'Honneur,

Qui nous a accueilli dans son laboratoire
et inspiré le sujet de cette thèse,

Avec notre respectueuse reconnaissance
pour le grand honneur qu'il nous fait de
bien vouloir en accepter la présidence.

A NOTRE MAITRE ,

MONSIEUR LE PROFESSEUR P. DESGREZ,
Professeur de Biochimie Médicale,

Qui nous a constamment conseillé et guidé
dans l'élaboration de ce travail,

En témoignage de toute notre reconnaissance
et de notre profond attachement.

A NOTRE MAITRE,

MONSIEUR LE PROFESSEUR L. JUSTIN-BESANCON

Professeur de Clinique Médicale,
Médecin de l'Hôpital Cochin,
Membre de l'Académie de Médecine,
Officier de la Légion d'Honneur,

Qu'il veuille bien accepter ici l'expression de notre profonde gratitude et de notre très respectueux attachement.

A NOTRE MAITRE,

MONSIEUR LE PROFESSEUR R. FAUVERT,

Professeur de la Chaire de Biologie Médicale,
Médecin de l'Hôpital Beaujon,

En respectueux hommage, et avec l'expression de toute notre reconnaissance pour son précieux enseignement.

A NOTRE MAITRE,

MONSIEUR LE PROFESSEUR M. DEROT,

Professeur de la Chaire de clinique Médico-sociale du
Diabète sucré et des maladies de la Nutrition,
Médecin de l'Hotel-Dieu,
Chevalier de la Légion d'Honneur,

En témoignage de notre respectueux attachement et de notre reconnaissance pour la formation qu'il nous a donnée.

A NOTRE MAITRE ,

MONSIEUR LE PROFESSEUR GILBERT-DREYFUS,

Professeur de Clinique Médicale,
Médecin de la Pitié,
Commandeur de la Légion d'Honneur,

A qui nous devons notre vocation pour l'Endocrinologie,

En remerciement pour son enseignement lumineux, et en témoignage de notre affectueux attachement.

A NOTRE MAITRE ,

MONSIEUR LE PROFESSEUR AGREGÉ M. PERRAULT,

Médecin de l'Hôpital Lariboisière,
Chevalier de la Légion d'Honneur,

Qui nous a fait découvrir des horizons
nouveaux,

Avec l'expression de notre profonde
gratitude.

A NOTRE MAITRE ,

MONSIEUR LE PROFESSEUR AGREGÉ B. DUPERRAT,

Médecin de l'Hôpital Saint-Louis,

Notre premier Maître d'Internat,

En respectueux hommage, et avec l'expres-
sion de notre affectueuse reconnaissance.

A NOTRE MAITRE

LE DOCTEUR R. WORMS,

Médecin de l'Hôpital Lariboisière,
Chevalier de la légion d'Honneur,

Qu'il veuille bien recevoir ici le
témoignage de notre affectueux attachement,
et de notre profonde gratitude
pour la formation clinique et humaine
qu'il nous a donnée.

A NOTRE MAITRE,

LE DOCTEUR R.A. SCHWOB,

Médecin de l'Hôpital Lariboisière,

Avec l'expression de notre fidèle
et respectueux attachement.

A NOTRE MAITRE,

LE DOCTEUR P. TANRET,

Médecin de l'hospice de Bicêtre,

Qui nous a accueilli dans son service,

En témoignage respectueux du plaisir
que nous éprouvons à travailler à
ses côtés.

A NOS MAITRES DANS LES HOPITAUX

STAGE

- 1947 Monsieur le Professeur P. HARVIER
 Monsieur le Professeur J. QUENU
- 1948 Monsieur le Docteur H. WELTI
 Monsieur le Professeur GILBERT - DREYFUS

EXTERNAT

- 1949 Monsieur le Professeur J. SENEQUE
- 1950 Monsieur le Professeur R. MOREAU
 Monsieur le Docteur R. CLAISSE
- 1951 Monsieur le Professeur agrégé B. DUPERRAT
 Monsieur le Docteur J. VIGNALOU
- 1952 Monsieur le Professeur J. HAGUENAU
 Monsieur le Professeur agrégé R. LAPLANE
- 1953 Monsieur le Professeur GILBERT - DREYFUS

INTERNAT

- 1955 Monsieur le Docteur R. WORMS.
 Monsieur le Docteur R.A. SCHWOB.
- 1956 Monsieur le Professeur M. DEROT.
- 1957 Monsieur le Professeur GILBERT - DREYFUS
 Monsieur le Professeur agrégé M. PERRAULT
- 1958 Monsieur le Professeur L. JUSTIN - BESANCON
- 1959 Monsieur le Professeur R. FAUVERT
 Monsieur le Docteur P. TANRET

A MES AUTRES MAITRES DANS LES HOPITAUX:

MM. Les Docteurs: ALBAHARRY, CORNET, HARTMANN,
LAMOTTE, PEQUIGNOT.

Professeurs Agrégés.

A MES CONFERENCIERS D'EXTERNAT ET D'INTERNAT:

Monsieur Le Docteur M.LEGRAIN.

Monsieur le Professeur Agrégé J.FAUREL.

Monsieur le Professeur Agrégé P.DEJOURS.

Monsieur le Professeur M.BOURREL.

MM. Les Docteurs : F.LAURENT,
R.DAUTRY.
S.CRESSON.
G.BOSQUET (in Memoriam)

A MES COLLEGUES DE L'INTERNAT DES HOPITAUX DE PARIS.

A MONSIEUR LE PROFESSEUR AGREGÉ E.E. BAULIEU ,
A MESSIEURS LES DOCTEURS

R. HENRY

P. PIGNARD

R. SCHOLLER

Qui n'ont cessé de nous prodiguer
leur aide et leurs conseils,

Hommage de notre sincère gratitude.

A MADAME R. DAVID-ISSARTEL

A MADemoiselle G. CHARRANSOL

Dont la collaboration dévouée
nous fut précieuse,

En témoignage de notre amitié
reconnaissante.

LES 17-HYDROXYCORTICOSTEROIDES PLASMATIQUES

(Hydrocortisone essentiellement)

ET LEUR DOSAGE CHIMIQUE

I N T R O D U C T I O N

A - Parmi les corticostéroïdes surrénaliens, les 17-hydroxycorticostéroïdes* forment un groupe assez homogène. Ils sont en effet caractérisés :

- biologiquement : par leur pouvoir essentiellement métabolique (d'où leur nom de glucocorticoïdes), et faiblement minéralocorticoïde.

- chimiquement : par la présence d'un oxhydrile en C17. Cet oxhydrile responsable des propriétés biologiques propres de ces corticoïdes, l'est aussi de leur dosage : en effet, la chaîne dihydroxyacétonique, $\text{CHOH-CO-CH}_2\text{OH}$, à laquelle il participe, réagit spécifiquement avec la phénylhydrazine en milieu sulfurique concentré pour donner naissance à une coloration jaune : tel est le principe de la réaction mise au point par PORTER & SILBER (II,44)

Cette réaction dose spécifiquement les stéroïdes porteurs de la chaîne dihydroxyacétonique.

Ces stéroïdes sont :

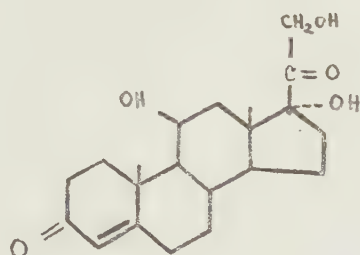
- essentiellement l'hydrocortisone : ou 17-hydroxycorticostérone ou cortisol ou composé F de Kendall.

* Autres appellations :

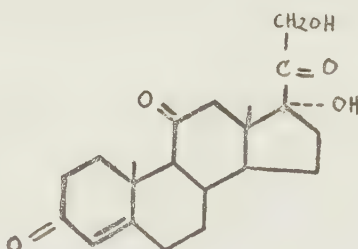
17-21 dihydroxy-20 cétostéroïdes, 17-21-dihydroxycorticostéroïdes, 17-OH-corticoïdes, 17-OH-es

Ces stéroïdes sont :

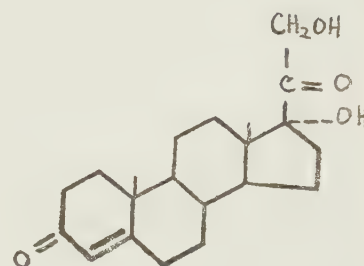
- 1' hydrocortisone : ou 17-hydroxy-corticostérone ou cortisol
ou composé F de Kendall
- la cortisone : ou 11-déhydro-17-hydroxy-corticostérone
ou composé E de Kendall.
- 1' Hormone S de Reichstein, ou 11-désoxy-hydroxy-corticostérone
et leurs métabolites di, tétra, hexahydrogénés, glycu-ro-conju-
gués ou non.



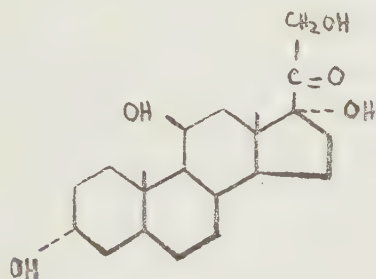
Hydrocortisone (F)



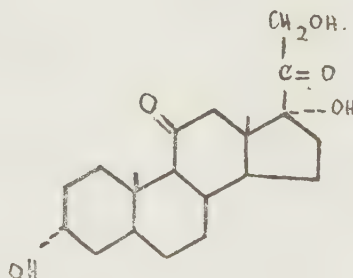
Cortisone (E)



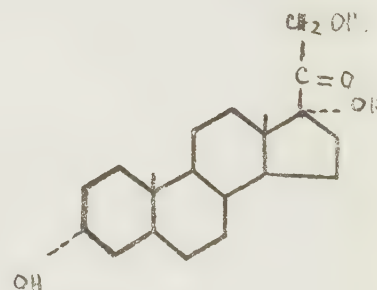
11-desoxy-17-hydroxy-corticosterone (S)



Tétrahydro-hydrocortisone
(H₄ F)



Tétrahydrocortisone
(H₄ E)



"Tetra S"

TABEAU N° 1 - les 17-hydroxycorticostéroïdes libres et leurs principales formes réduites.

Tous ces stéroïdes existent sous deux formes, de signification différente.

B - Avant d'aborder l'étude des 17-hydroxycorticostéroïdes, nous voudrions rappeler que l'hydrocortisone en est de loin le principal, pour ne pas dire l'exclusif représentant. Aussi bien tout ce qui sera dit au sujet de ces stéroïdes dans le plasma, pourra s'appliquer à l'hydrocortisone.

La réciproque peut être en partie considérée comme vraie. Cependant, dans un souci d'exactitude, nous avons voulu garder le terme de 17-hydrocorticostéroïde, chaque fois que l'hydrocortisone n'était pas exclusivement en cause.

C - Nous envisagerons successivement :

I - les principales notions concernant la nature et la forme des 17-hydroxycorticostéroïdes circulant dans le sang périphérique en insistant plus spécialement sur la stéroïdoconjugaison et la liaison stéroïde-protéine.

II - puis, dans un second chapitre, l'étude analytique des principes généraux et des différentes étapes du dosage des 17-hydroxycorticostéroïdes plasmatiques.

III - nous décrirons ensuite au chapitre III une technique personnelle de dosage des 17-hydroxycorticostéroïdes libres et conjugués. Cette technique est inspirée de celles de SILBER & BUSCH pour les libres, et de BONGIOVANNI & EBERLEIN pour les conjugués.

Les différentes caractéristiques de la méthode seront définies en fonction des techniques les plus couramment employés, et les principaux résultats en seront donnés.

IV - le dernier chapitre sera consacré à une brève revue des applications cliniques du dosage des 17-hydroxycorticostéroïdes plasmatiques, telle qu'elle apparait à la lecture des principaux travaux.

CHAPITRE I

I - LES 17-HYDROXYCORTICOSTEROIDES SANGUINS

Les 17-hydroxycorticostéroïdes plasmatiques existent sous deux formes de signification différente.

- forme libre, qui est celle du stéroïde natif et actif, non métabolisé
- forme conjuguée, qui représente le métabolite inactif de la précédente.

La conjugaison comprend elle-même deux variétés essentielles : la glycu- et la sulfoconjugaison, la première étant prépondérante. Mais il existe d'autres modes de conjugaison.

A - LES 17-HYDROXYCORTICOSTEROIDES LIBRES

Les études chromatographiques suivies d'identification chimique et physique (BUSH, SANDBERG, I, 18, BLISS, I, 5, ROMANOFF, I, 66, 67, SWEAT, I, 77, 78, 79) (ROMANI I, 65, SAVARD, I, 7273), ont montré que l'hydrocortisone libre est le principal, pour ne pas dire le seul 17-hydroxycorticostéroïde du sang surrénal et périphérique, (alors que c'est la tétrahydrocortisone glycuconjuguée H_4EG pour les urines), (BUSH, I, 18, BAGGET I, 3). La cortisone (MORRIS I, 52) et peut-être l'hormone S (11-désoxy-17-hydroxycorticostérone) seraient en quantité tout à fait minime. ROMANOFF et coll. (I, 66, 67) n'ont pas pu les mettre en évidence.

La prépondérance de l'hydrocortisone est telle que le dosage des 17-hydroxycorticostéroïdes peut être considéré, rappelons-le, comme celui de l'hydrocortisone.

B - LES 17-HYDROXYCORTICOSTEROIDES CONJUGUES

Une fraction importante des 17-hydroxycorticostéroïdes plasmatiques se trouve sous forme conjuguée. Les 17-hydroxycorticostéroïdes conjugués représentent en quantité, les 2/3 environ des 17-hydroxycorticostéroïdes libres.

Il existe plusieurs modes de conjugaison :

I - LA GLYCUROCONJUGAISON

est prépondérante, du moins pour les 17-hydroxycorticostéroïdes.

a) La tétrahydro-hydrocortisone glycuconjuguée (H_4FG) a été isolée du sang périphérique. (BONGIOVANNI & coll. I,11b, ROMANOFF & Coll. I,66, 67),

L'existence de tétrahydrocortisone glycuconjuguée (H_4EG) est probable à l'état physiologique : ROMANOFF & coll. (I,66), SAVARD (I,72,73), ROMANI (I, 65).

La tétrahydro-hydrocortisone, la di- et la tétrahydrocortisone ont été identifiées dans le sang par BONGIOVANNI et coll. (I,10) après administration de fortes doses d'hydrocortisone per os.

b) Mécanisme

Les recherches récentes ont montré que la β -glycuronidase ne participait pas à la synthèse des glycuconjugués. La α -glycuronidase existe en effet dans de nombreux tissus, que ceux-ci synthétisent ou non des glycuronides. Les inhibiteurs de la β -glycuronidase comme la saccharo-lactone, sont sans effet sur la synthèse des glycuronides (LEVY, I,47).

DUTTON & STOREY les premiers (I,30) ont élucidé le mécanisme de la biosynthèse des glycuronides.

Ajouté à un extrait de foie de souris, et à un accepteur, l'acide uridine-diphosphate-glycuronique (UDPGA) conduit à la synthèse des glycuronides. ISSELBACHER & AXELROD (I,43) ont réalisé ainsi celle des glycuronides de tétrahydro-cortisone, de phénolphtaléine et de thyroxine. Le transfert du radical actif (l'acide glycuronique) sur l'accepteur (ici, un groupement OH de la molécule stéroïdienne) serait assuré par un enzyme propre, très fragile, la glycuconyle-transférase, selon la réaction suivante :



Au cours de ce transfert, une inversion de WALDEN parait probable, convertissant la liaison (en un)-glycuronide.

Mais comme l'ont montré les expériences de BROWN & coll. (I,12,13), de ENGLERT (IV, 29), la glycuconjugaison n'intervient qu'après la réduction du stéroïde. Ainsi, la glycuconjugaison de l'hydrocortisone n'a lieu qu'après réduction de celle-ci en tétrahydro-cortisone. Elle est plus rapide en présence de dihydrocortisone et surtout de tétrahydro-cortisone. La réduction est catalysée par un système enzymatique.

Comme nous le reverrons à propos du rôle du foie, c'est ce temps de réduction qui est atteint dans les insuffisances hépatiques, alors que la glycuconjugaison n'est pas altérée.

Ce n'est que récemment qu'a été objectivée l'insuffisance congénitale du système enzymatique qui catalyse la glycuconjugaison. Ce déficit génétique constitue le trouble biologique majeur de la maladie de Gilbert et du syndrome de Crigler-Najjar (PETERSON IV,60). De ce fait, la bilirubine comme les stéroïdes humoraux ne sont plus glycuconjugés ni éliminés par la bile.

2 - LA SULFOCONJUGAISON

a) L'existence de 17-hydroxycorticostéroïdes sulfoconjugés dans le plasma est probable, mais aucun travail d'ensemble ne semble leur avoir été consacré.

L'existence de 17-hydroxycorticostéroïdes sulfoconjugés dans les urines, a été par contre prouvée: PASQUALINI (I,55) a isolé de très petites quantités de tétrahydro-hydrocortisone et de tétrahydro-cortisone sulfoconjugés (H_4FS , H_4ES).

b) Mécanisme

Le système enzymatique qui préside à la sulfoconjugaison a été localisé dans le foie et l'intestin par la technique des coupes de tissus. (BERNHEIM ARNOLT, de MEIO (in Jayle I,44)).

L'agent actif a été détecté par HILZ et LIPMANN, qui l'ont défini comme le 3'phosphoadénosine - 5' phosphosulfate (PAPS) (in JAYLE I,44). Une sulfo-kinase assure là aussi le transfert des radicaux actifs sur l'accepteur.

3 - Mais la CONJUGAISON STERODIENNE semble ne pas se limiter aux glycuronates et aux sulfates. De la déhydro-épiandrostérone liée à un composé phosphoré a été récemment isolée des urines par OERTEL & EIK-NES (I,54).

EADES et coll. (I,31) ont identifié dans les urines, après hydrolyse acide, un stéroïde conjugué notamment à la glycine. Mais s'agit-il là vraiment d'une véritable conjugaison ou d'une forme de liaison stéroïde-protéine ?

BAULIEU a mis en évidence dans le sang d'une jeune fille atteinte d'une tumeur maligne virilisante de la surrénale, un ester-sulfate de 5-androstène-3 ol-17-one (déhydroepiandrostérone ou D.H.E.A). (I,4).

Aucun fait de ce genre n'a été signalé à ce jour dans le sang à propos des 17-hydroxycorticostéroïdes.

4 - LIEU DE LA CONJUGAISON

La conjugaison des stéroïdes se fait essentiellement au niveau du foie. Il n'est pas impossible, encore que non démontré, qu'elle puisse se faire au niveau du rein (LIPSCHITZ et BUEDING - in JAYLE, I,44) ou même d'autres tissus (MIGEON & Cell. I,49).

Comme les autres processus de conjugaison hépatique, elle est considérée comme un procédé de détoxication. Peut-être faut-il rapporter à cette action le fait que les 17-hydroxycorticostéroïdes conjugués ont une clearance rénale nettement supérieure à celle des 17-hydroxycorticostéroïdes. LEVY met en doute cette conception, du moins en ce qui concerne les substances exogènes ; la fonction alcool du stéroïde viendrait s'intégrer dans un processus métabolique normal.

e

La signification relative de la glycu- et de la sulfoconjugaison est inconnue.

L'absence de conjugaison en tous cas, contrairement à ce que l'on pourrait présumer, ne paraît pas retentir notablement sur le métabolisme hormonal ; tel est le cas de la maladie de Gilbert où l'absence congénitale de glycuconjugaison paraît très bien tolérée quant aux stéroïdes du moins.

5 - SPECIFICITE DE LA CONJUGAISON

De l'ensemble des travaux de De MEIO (in JAYLE I,44), ROY (in JAYLE I,44), SCHNEIDER & LEWBART (I,74), il résulte que la structure des stéroïdes influence leur conjugaison : si les 3 β -stéroïdes sont conjugués à l'acide sulfurique, les 3 α -hydroxystéroïdes à 21 C le sont très facilement.

JAYLE (I,44) a également noté une spécificité relative pour la glycuconjugaison : ainsi les 3 α -hydroxystéroïdes à 21 C ne sont détectables que dans la fraction sulfoconjuguée. Parmi les 17-hydroxycorticostéroïdes il n'y a nous l'avons vu, dans les urines, que très peu de tétrahydro-hydrocortisone (H₄F) et de tétrahydro-cortisone (H₄E) sulfoconjugués (PASQUALINI, I,55), les stéroïdes à 21 C étant en majeure partie glycuconjugus.

Cette spécificité de la conjugaison en fonction de la morphologie moléculaire du stéroïde est encore prouvée par le métabolisme de certaines hormones de synthèse : il est remarquable en effet de constater que les 17-hydroxycorticostéroïdes de synthèse du type Δ 1-hydrocortisone, Δ 1-cortisone, ou Δ 1-9 α F-hydrocortisone par exemple, ont un métabolisme différent de celui des hormones naturelles (I 75 a et b).

Administrées per os et contrairement à ces dernières, les hormones de synthèse ne sont pratiquement pas conjuguées. Certains auteurs (I 75 a et b) ont voulu voir dans ce fait - particulièrement frappant lors des dosages urinaires - une explication possible de l'action biologique souvent plus marquée à des concentrations moindres, de ces stéroïdes par rapport aux hormones naturelles : hypothèse logique puisque la conjugaison aboutit à une inactivation de l'action hormonale.

Cette spécificité de la conjugaison paraît d'autant plus réelle que tous ces stéroïdes de synthèse ont leur groupement Δ^4 -300 et leur chaîne dihydroxy-acétonique en C17 parfaitement libres. Or, c'est au niveau de l'un de ses 2 groupements que se ferait la conjugaison : rien ne s'opposerait donc en théorie à ce que ces stéroïdes soient conjugués comme leurs homologues naturels, à moins d'invoquer précisément, comme nous le verrons à propos de la liaison stéroïde-protéine, une spécificité étroitement liée à la structure générale de la molécule. La moindre modification "configurative" de la molécule stéroïdique, même si elle n'intéresse pas les principaux groupes réactionnels, peut modifier complètement son métabolisme.

L'exaltation du pouvoir biologique de certains stéroïdes ne relève pas uniquement, de tout évidence, de l'absence de conjugaison hépatique : on s'expliquerait mal que l'adjonction d'un méthyl en C6 ou en C16 sur la molécule de la Δ^1 -9 β -F-hydrocortisone vienne modifier considérablement le pouvoir anti-inflammatoire ou électrolytique - en plus ou en moins - de ces corps. L'action "renforçatrice" habituelle vis-à-vis des propriétés d'un corps donné, du groupement CH₃ est un phénomène d'observation courante en chimie.

C - LES STEROIDES-PROTEINES

En fait, les 17-hydroxycorticostéroïdes libres ou conjugués sont essentiellement liés aux protéines. Comme le soulignent à juste titre ROBERTS, SZEGO (I,80) et BUSH (I,15) le terme de liaison est très vague. Il faudrait s'attacher à mieux définir ce mot qui devrait impliquer la composition relativement constante du complexe stéroïdo-protéique et la nécessité de protéines métaboliques à la formation de ce complexe.

Aussi jusqu'à présent, et faute de précisions plus nombreuses, les termes de complexe, liaison, fixation, association sont-ils indifféremment employés.

La liaison stéroïde-protéine fait partie en réalité d'un processus biochimique beaucoup plus général, qui déborde largement le cadre des stéroïdes.

Les "associations" thyroxine-protéine, fer-sidérophylle, cuivre-céruléoplasmine, montrent bien l'importance des liaisons avec les protéines, quel que soit leur rôle : de support et/ou de transport.

Les 17-hydroxycorticostéroïdes n'échappent pas à ce fait.

Malgré de nombreux travaux consacrés à ce sujet, bien des obscurités persistent encore.

I - MODE DE LIAISON

UPTON et BONDY (I, 85), puis BUSH (I, 15) dialysent la 4-14 C hydrocortisone introduite dans le plasma contre une solution saline, constatent l'existence de deux composants plasmatiques.

- l'un de haute affinité, saturé pour une concentration physiologique de l'hydrocortisone de l'ordre de 20 μ g/100 ml.
- l'autre de basse affinité, mais de grande capacité puisque à peine saturé pour une concentration d'hydrocortisone de 120 μ g/100 ml, comme le montre la figure n° I.

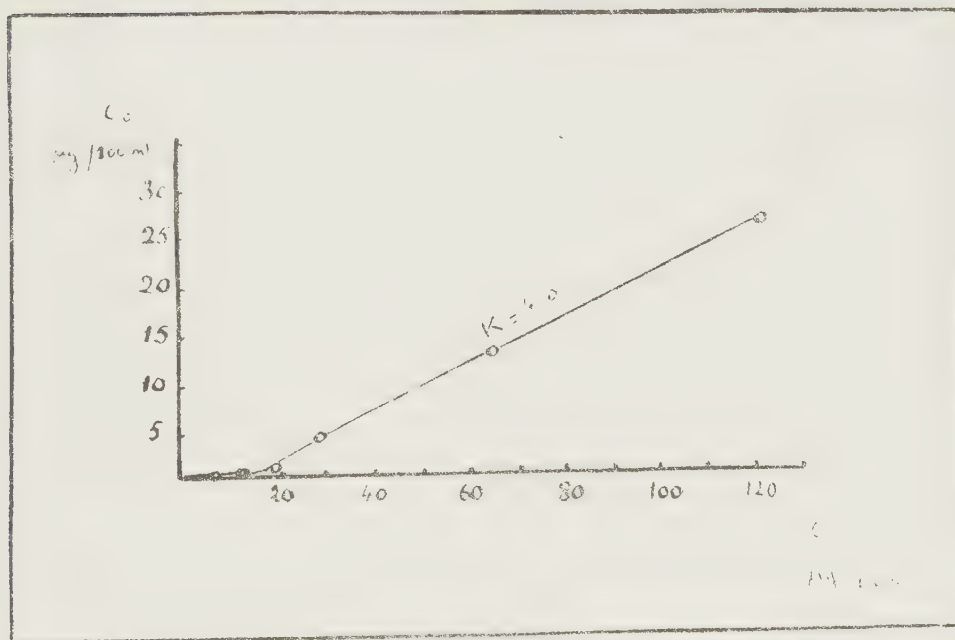


FIG N° I - Courbe de distribution de l'hydrocortisone entre le plasma et une solution saline de dialyse à 37-38°. (Ci = concentration de la F dans le plasma ; Co = Concentration de la F dans le liquide de dialyse.

Ainsi, à l'état normal, lorsque la concentration d'hydrocortisone est comprise entre 10 et 15 $\mu\text{g}/100\text{ ml}$, l'hydrocortisone est fixée principalement aux protéines (DAUGHADAY I, 22, : 99 %), le rapport $\frac{\text{hydrocortisone fixée}}{\text{hydrocortisone libre}}$ étant voisin de 10.

Au dessus de 20 $\mu\text{g}/100\text{ ml}$, il s'abaisse à 4.

Injectant 1 μc d'hydrocortisone 4C^{14} , HOLNESS (I,40) retrouve également, après dialyse, 98 % de la radioactivité injectée liée aux protéines. Mais l'affinité de l'hydrocortisone pour les protéines diminue très vite pour des concentrations plus élevées.

La corticostérone se comporte à cet égard comme l'hydrocortisone, alors que la liaison oestrone-protéine ne serait pratiquement pas influencée par la concentration de l'oestrone (fig. N° 2).

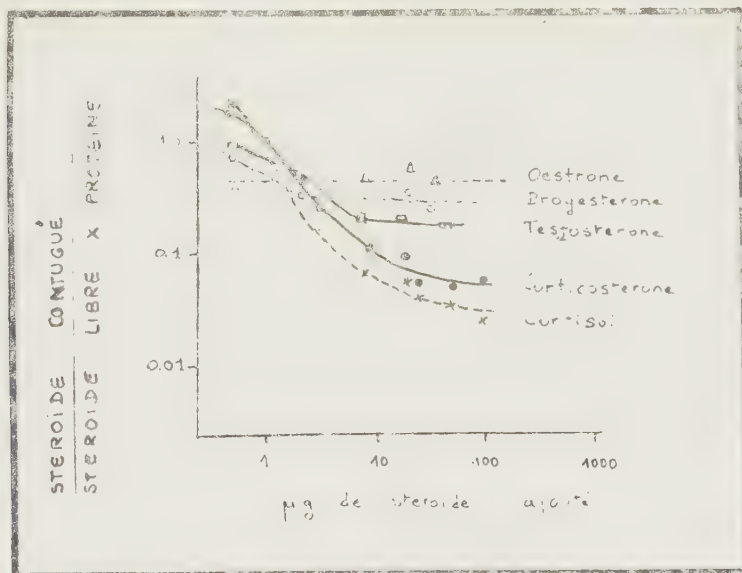


FIG N° 2. - Variations de l'affinité de liaison du plasma humain normal pour l'hydrocortisone 4-C^{14} , la progestérone 4-C^{14} , la testostérone 4-C^{14} , et l'oestrone 16-C^{14} en présence de quantités croissantes de stéroïdes.

En résumé, à quelques variantes de pourcentage près, tous les auteurs sont d'accord (UPTON & BONDY, DAUGHADAY, BUSH) pour estimer qu'il existe deux systèmes différents de liaison hydrocortisone-protéine en fonction de la concentration plasmatique de l'hydrocortisone.

Quant à la nature de l'hydrocortisone liée, elle est mal connue. SZEGO n'a pas identifié par chromatographie la forme d'hydrocortisone liée à l'albumine.

II - LA NATURE DE LA PROTEINE liée a été très discutée.

Pour la majorité des auteurs, c'était l'albumine. (EIK-NES et coll. I, 32 ; WHESTPHAL & Coll. I, 94,95)

C'était l'avis de DAUGHADAY dans un de ses premiers travaux (I, 22,23). Mais DAUGHADAY, reprenant ses études avec de l'hydrocortisone 4 C^{14} (I, 25, 26), conclut :

a) que le système dit de haute affinité est représenté par une γ -globuline, de la fraction IV_4 de COHN, qui a l'affinité la plus élevée pour l'hydrocortisone et la corticostérone.

Cette liaison serait très spécifique : SLAUNWHITE & Coll. viennent de confirmer récemment (I, 76) l'opinion de DAUGHADAY. L' γ -globuline aurait une telle spécificité pour les stéroïdes, que par analogie avec la transferrine, la céruléoplasmine, ils l'ont appelée la "transcortine".

b) L'albumine constitue le système "fixateur" de basse affinité. L'affinité de l'hydrocortisone étant beaucoup plus grande pour l' γ -globuline, celle-ci est saturée en premier.

Pour BUSH (I, 15) les expériences de DAUGHADAY sont entachées d'erreur car elles ont été faites à 4° et sur plasma hépariné, ce qui modifie la constante de dissociation de certains complexes stéroïdes-protéines et la mobilité des lipo-protéines.

Le tableau N° 2, établi par EIK-NES et Coll. (I, 32) montre que l'affinité de la plupart des stéroïdes pour les protéines est inversement proportionnelle à leur solubilité dans l'eau. En d'autres termes, plus le stéroïde est polaire, moins il se lie aux protéines et, notamment, à l'albumine. SLAUNWHITE & Coll. ont également constaté que l'hydrocortisone libre et la corticostérone ont moins d'affinité pour l'albumine que les stéroïdes conjugués et surtout les métabolites de l'oestradiol, de la testostérone et de la progestérone.

GROUPE	Solubilité eau	Liaison protidique
E, DOCA	+++	-
Δ ⁴ - Androstène - dione, Testostérone, 17-CH ₃ -testostérone Etiocolanolone Déhydroépiandrostérone	+	+
Oestradiol Androstane - one Δ ⁴ - androstane - one	-	+++

Tableau N° 2 - Affinité de différents groupes de stéroïdes pour les protéines en fonction de leur solubilité dans l'eau.

D'après EIK-NES et coll.

En fait, comme SZEGO l'a remarqué (I, 82) la nature de la protéine liée semble dépendre aussi du milieu environnant.

Incubée en présence de sérum seul, l'hydrocortisone 4-14 C est peu liée à l'albumine, se situant sur l'électrophorèse au-delà de la zone des globulines.

Le phénomène inverse s'observe en présence d'homogénat de foie : il semble que la présence du foie soit nécessaire à la formation significative du complexe stéroïde-protéine in vitro. La cortico-stérone se comporte identiquement.

Contrairement à ce qui avait été annoncé (ROBERTS & SZEGO I, 81) il est possible que la liaison stéroïde-protéine soit, comme la conjugaison, catalysée par un système enzymatique. En effet, l'absence d'uridine - diphosphate-glucose (U.D.P.G.), de D.P.N., ou de Glucose, ou à l'opposé, la présence de métaux lourds, d'un chélateur (Versene) diminuent l'activité du substrat, et par le fait la quantité de stéroïde lié. Ce phénomène est vraisemblablement différent dans son mécanisme et sa signification du "phénomène de compétition" entre stéroïdes.

SAMUELS (Discussion in article de SZEGO I, 82) et ROBERTS ne pensent pas que le système enzymatique puisse être saturé et estiment que le seul tropisme pour la protéine intervient.

III - PHENOMENE DE COMPETITION

Les différences d'affinité des divers stéroïdes pour l'albumine et la globuline expliquent l'existence de "Phénomène de Compétition", entre eux.

Ainsi, l'hydrocortisone entrave la liaison oestrone-protéine. L'inhibition est proportionnelle à la concentration de l'hydrocortisone, et inversement à celle de l'oestrone (SZEGO).

Le pouvoir bloquant existe à des degrés variables et de façon réversible pour la corticostérone et la 11-désoxy-corticostérone (DOC).

D'une manière générale, un stéroïde empêchera d'autant plus la liaison hydrocortisone protéine, qu'il possèdera au moins 2 hydroxyles en position 11, 17, ou 21, et le groupement 4-3 CO dans le noyau A.

A ce propos, WESTPHAL (I, 94) avait déjà montré en 1957, que le groupement 4-3 CO participait à la liaison stéroïde-protéine.

L'effet compétitif est par contre nettement diminué par la présence d'une cétone en 11, d'un hydroxyle en 11, d'un groupement aldéhydique en 18, ou fluoré en 9. (DAUGHADAY I, 23).

En fait, il est difficile d'induire exactement le pouvoir compétitif des stéroïdes entre eux "in vivo" d'après des expériences faites "in vitro". On conçoit aisément, que les concentrations relatives des divers corticoïdes puissent modifier le taux, le lieu et la qualité de la liaison hydrocortisone-protéine, et par conséquent, déterminer dans des limites importantes la qualité de l'extraction de l'hydrocortisone par des solvants organiques.

Jusqu'à présent, cependant, quelques dosages de 17-hydroxycortico-stéroïdes ne nous ont pas donné de différences significatives qu'il y ait ou non traitement du plasma par l'éthanol avant l'extraction par le dichlorométhane. BUSH (I, 19) pense également que la dénaturation des protéines avec lyse des cénapses ne provoque pas de gain appréciable dans l'extraction des stéroïdes. EIK-NES et Coll. (I, 32) aussi, qui estiment que si des quantités importantes de stéroïdes sont liées aux protéines, les liaisons sont facilement brisées par les solvants organiques.

IV - LA NATURE même de la liaison stéroïde-protéine est inconnue. Très vraisemblablement, les forces de Van der WAALS et les ponts hydrogène jouent un rôle important (DEVIS I, 28, a) de même que les interactions polaires et le dipôle ionique (EIK-NES et coll. I, 32).

V - LA SIGNIFICATION de la liaison stéroïde-protéine reste encore mystérieuse. Beaucoup d'auteurs lui attribuent un rôle de transport. (DEVIS I, 28 a, DAUGHADAY I, 21 et suite).

Elle permettrait notamment aux stéroïdes de franchir la membrane cellulaire.

Elle interviendrait également dans la solubilité des stéroïdes au sein du plasma. Pour BISCHOFF et PILHORN, 70 % à 80 % de la solubilité de la testostérone et de la progestérone seraient dûs à leur liaison avec l'albumine.

La liaison stéroïde-globuline aurait à cet égard un effet moins marqué.

- un rôle de coenzyme n'est pas impossible : la fixation du stéroïde à un coenzyme explique peut-être l'inhibition ou la catalyse de certains enzymes par les corticostéroïdes : HAYANO, DORFMAN et YAMADA ont aussi montré l'inhibition de la d- amino-acido-oxydase par la DOCA.

Une comparaison ne peut manquer d'être établie avec la thyroxine dont une faible partie est libre et la majorité liée aux protéines.

ROBBINS et RALL (I, 64) ont suggéré que la fraction active de l'hormone thyroïdienne était la fraction libre.

Il en est de même pour l'hydrocortisone. Dans les deux cas, la concentration plasmatique de l'hormone liée ne constituerait qu'un témoin indirect de celle de l'hormone physiologiquement active.

D - STEROIDES ET GLOBULES ROUGES

Les rapports entre stéroïdes et globules rouges sont très controversés. Il était dit couramment que les stéroïdes passaient facilement dans les globules rouges, d'où la recommandation de centrifuger rapidement le sang après prélèvement et de récupérer le plasma.

BUSH (I, 29) n'a pas retrouvé dans 14 cas sur 15 d'hydrocortisone dans les globules rouges. L'absence d'hydrocortisone serait peut-être due pour cet auteur à une erreur de technique. BUSH avait utilisé des globules rouges lavés et suggère que la disparition de l'albumine fixée à la périphérie du globule serait responsable du départ de l'hydrocortisone.

En d'autres termes, les stéroïdes ne pénétreraient pas dans les globules rouges, mais seraient fixés à leur surface, vraisemblablement par l'intermédiaire de protéines. Par contre, PETERSON et coll. (I, 58) trouvent 20 à 25 % d'hydrocortisone fixée aux globules rouges.

MIGEON et coll. (cité dans I, 19) ont entrepris deux séries d'étude : l'une "in vivo" leur aurait montré que 30 à 40 % des 17-hydroxycorticostéroïdes libres seraient liés aux globules rouges (5 % seulement leur restant fixés

dans l'atmosphère plasmatique périglobulaire persistante après centrifugation, et étant détachés par un lavage salin des globules).

Par contre, il n'y aurait pas de 17-hydroxycorticostéroïdes con-
jugés fixés aux hématies.

L'autre étude "in vitro" permet de retrouver fixée aux globules rouges 25 % de l'hydrocortisone marquée, alors que pour les oestrogènes, le rapport globules rouges ne serait que de $\frac{1}{5}$ (WALL et MIGEON).
plasma

Mais ces auteurs ne peuvent préciser si les 17-hydroxycorticostéroïdes sont réellement dans l'hématie elle-même, ou simplement adsorbés à sa surface PRUNTY et BUSH (in I, 19) invoquent le rôle possible du potassium et du sodium, mais aussi du glucose, du CO_2 , du pH et de la concentration ionique d'une manière plus générale, dans la régulation de l'entrée éventuelle et de la sortie des 17-hydroxycorticostéroïdes, du globule rouge.

Ce rôle certainement important du milieu environnant expliquerait pour une part les résultats divergents de BUSH et de MIGEON.

En tout cas, dans les polyglobulies primitives, pour des chiffres de globules rouges allant de 6 500 000 à 8 000 000, nous avons toujours trouvé des chiffres normaux de 17-hydroxycorticostéroïdes. ~~En n.~~

II - METABOLISME NORMAL DES 17-21-DIHYDROXYCORTICOSTEROIDES

A - RYTHME ET SECRETION JOURNALIERE DES 17-21-DIHYDROXYCORTICOSTEROIDES

I - LES VARIATIONS NYCTHEMERALES des 17-21-dihydroxycorticostéroïdes sont maintenant bien connues : BROWN et coll. (I, 12), REDDY et coll. (II, 46,47), MIGEON et coll. (I, 50) (voir figures 3 et 4)

Ce rythme disparaît chez l'addisonien traité par perfusion d'hydrocortisone à raison de 1 mg/heure/24 heures, et après injection d'ACTH la nuit.

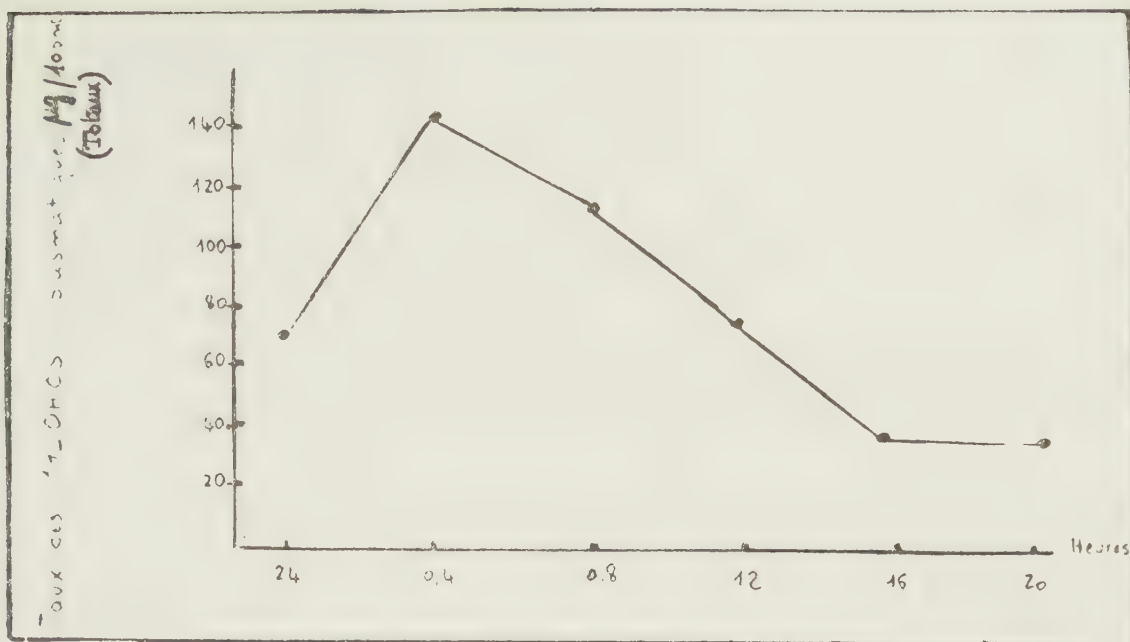


FIG N° 3 - Variations journalières du taux des 17-OHCS totaux plasmatiques chez un sujet normal.

D'après REDDY et coll.

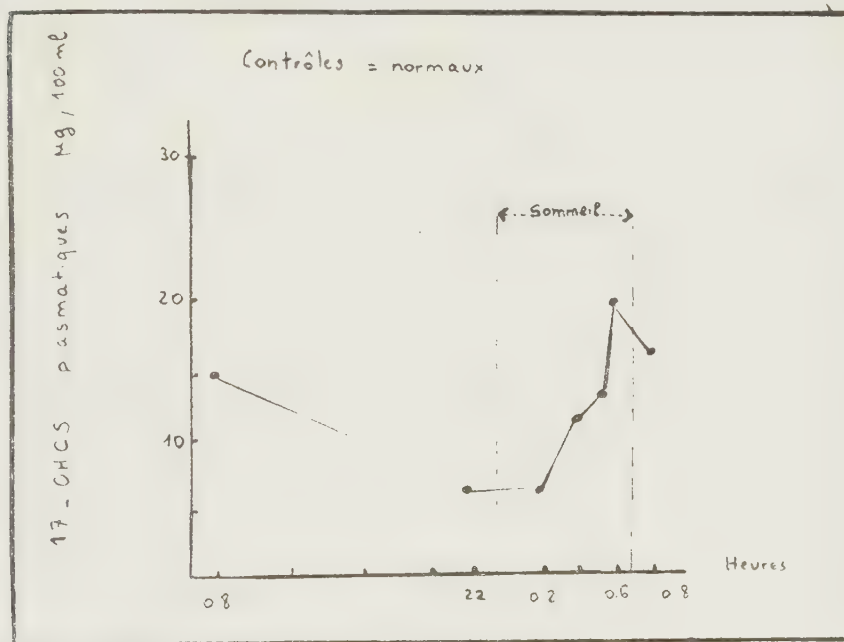


FIG N° 4 - Variations moyennes du taux des 17-OHCS plasmatiques chez des sujets normaux durant la nuit.

D'après MIGNON et coll.

EIK-NES et CLARK (IV, 25) ont montré la disparition du cycle nycthéméral normal chez des sujets porteurs de graves lésions cérébrales (secondaires à un traumatisme ou à une encéphalopathie) avec troubles de la conscience. Bien plus, chez ces sujets, aucun rythme, même atypique, ne peut être mis en évidence, les variations quotidiennes étant différentes d'un jour à l'autre, toutes choses égales ailleurs.

MASON (cité dans EIK-NES et CLARK) a rapporté la disparition du cycle nycthéméral chez des singes dont on avait détruit le fornix.

Si un mécanisme nerveux, vraisemblablement diencéphalique préside au rythme sécrétoire normal des 17-hydroxycorticostéroïdes - comme c'est d'ailleurs le cas pour l'aldostérone (RAUSCHKOLS, FARRELL) l'A.C.T.H. et la plupart des stimulines hypophysaires - on n'en connaît pas les facteurs déterminants. La perception de l'environnement, l'activité du sujet ne suffisent certainement pas puisque les aveugles, les travailleurs de nuit, les sujets soumis au jeûne depuis 24 heures ou prenant un repas toutes les quatre heures, ont un cycle normal (MIGEON et coll. I, 50) (LAIDLAW et coll IV, 50)

Il est difficile dans ces conditions de voir dans ce rythme nycthéméral l'unique adaptation de la surrénale à la mise en activité ou au repos de l'organisme.

La sécrétion corticosurrénale s'intègre dans un cadre plus vaste de rythmes biologiques propres à l'individu, dont celui du fer est un exemple aussi mystérieux. Cette sécrétion des 17-hydroxycorticostéroïdes est certainement commandée par l'A.C.T.H. qui possède vraisemblablement elle aussi son rythme propre. Il serait à cet égard intéressant d'étudier le devenir du cycle des 17-hydroxycorticostéroïdes chez des sujets hypophysectonisés.

II - LA SECRETION SURRENALE QUOTIDIENNE

BONDY et ALTROCK (I, 7) ont essayé de la définir en utilisant le cathétérisme de la veine rénale gauche à distance ou près de la veine

surrénale gauche, associé à la mesure du flux plasmatique rénal par le PAH. Le débit surrénal est alors donné par la formule :

$$D = C \% \text{ I7-OHCS (Artère périphérique-veine rénale) } \times \text{ Flux plasmatique rénal}$$

Deux réserves doivent être faites :

- le sang de la veine rénale est en fait un mélange de sang rénal et surrénal, et l'on conçoit que sa composition varie en fonction de la position du cathéter et de la rapidité du flux rénal.

- Cette technique présuppose le fonctionnement égal des deux glandes surrénales et des deux reins.

BONDY et ALTROCK (I, 7) ont constaté que la quantité d'hydrocortisone sécrétée par jour serait comprise entre 17 et 29 mg.

Ces chiffres constituent une estimation très vraisemblable. La quantité d'hydrocortisone quotidienne nécessaire à l'équilibration d'un Addisonien est effectivement comprise entre 15 et 30 mg en moyenne par jour.

Partant de l'étude du turn-over de l'hydrocortisone, PETERSON et WYNGAARDEN (I, 58, 57) sont parvenus aux mêmes chiffres (17-29 mg) chez 9 sujets normaux.

HELLMAN et coll (I, 38) trouvent 30 mg environ.

B - CATABOLISME des I7-HYDROXYCORTICOSTEROIDES

Il est encore peu connu. Versés dans le torrent circulatoire, les 17- **hydroxycorticostéroïdes** sont très rapidement liés aux protéines qui leur serviraient de véhicule.

I - LE PLASMA

a) le destin plasmatique de l'hydrocortisone a été bien étudié par l'emploi des traceurs radioactifs.

PETERSON et coll (I, 58, 60) étudiant la courbe de disparition de la F 4-¹⁴ C ont trouvé une demi-vie de 60 à 90 minutes, chez les sujets normaux.

MIGEON et coll. (I, 49) trouvent une demi-vie de 80 minutes, SAYERS et coll 80 à 140 minutes.

Mais il faut remarquer que la radioactivité mesurée ne représente pas seulement l'hydrocortisone libre, mais également - et surtout en fait - ses métabolites.

HELLMAN et coll. (I, 38), MIGEON ont noté en effet que 15 à 20 minutes après l'injection, on ne retrouvait que 15 % environ de l'hydrocortisone non métabolisée. Si l'on étudie l'élimination urinaire, on constate finalement que moins de 1 % de l'hydrocortisone est éliminée sans modification. Par conséquent, comme il en est de même pour la bile où l'hydrocortisone libre est à l'état de traces, 99 % environ de l'hydrocortisone sont métabolisés, et ceci rapidement, avant l'élimination biliaire et urinaire.

Comme nous le verrons à propos du foie, cette dégradation métabolique se fait en deux temps, chacun commandé par un système enzymatique propre :

- 1er temps, de réduction, qui aboutit à la formation de dérivés di- puis tétrahydrogénés de l'hydrocortisone et de la cortisone.
- 2e temps, plus rapide, de conjugaison.

b) Le reflet de ce métabolisme apparaît nettement à l'étude des variations du taux des 17-hydroxycorticostéroïdes libres et conjugués, après administration de fortes doses d'hydrocortisone marquée.

MIGEON et coll, PETERSON ont ainsi observé l'augmentation très rapide des 17-hydroxycorticostéroïdes libres, contemporaine de l'injection puis leur décroissance progressive, rapide pendant les 30 premières minutes (cette première phase aboutit à un équilibre avec les stéroïdes non radioactifs), beaucoup plus lente pendant les heures suivantes.

Et tandis que les 17-hydroxycorticostéroïdes libres diminuent, le taux des 17-hydroxycorticostéroïdes conjugués monte, après un certain délai, pour atteindre un pic vers la deuxième heure qui suit l'injection. A ce moment, le taux des 17-hydroxycorticostéroïdes libres et conjugués s'équilibre et les deux courbes se croisent. Les 17-hydroxycorticostéroïdes conjugués restent alors un peu en plateau avant de diminuer (cf. fig. N°5).

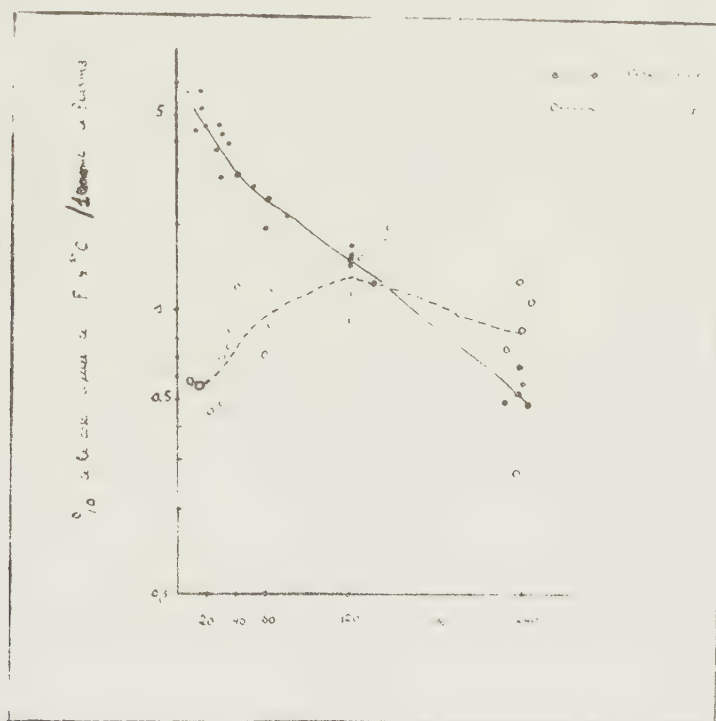


FIG. N°5 - Variations de la radio-activité plasmatique chez 5 sujets-contrôle après injection de 4- 14 C Cortisol.

D'après MIGEON et coll.

L'existence de ces transformations métaboliques de l'hydrocortisone est encore prouvée par l'étude de la demi-vie des dérivés hydrogénés de l'hydrocortisone ou de la cortisone, à savoir la tétrahydrohydrocortisone, la tétrahydro-cortisone, la dihydro-cortisone. Tous ces corps ont une demi-vie plus courte que celle de l'hydrocortisone, car ils ont déjà franchi un stade métabolique. Le comportement différent de ces métabolites a été particulièrement précieux pour préciser le trouble fonctionnel observé dans les cirrhoses.

Durant son séjour plasmatique, l'hydrocortisone est rapidement liée aux protéines, en proportion variable, selon sa concentration : liaison avec une γ -globuline pour un taux n'excédant pas 20 ug/100 ml, avec l'albumine pour des concentrations plus élevées, nous l'avons vu.

Il faut enfin noter deux faits :

- la demi-vie de l'hydrocortisone libre non marquée, administrée à fortes doses (hydrocortisone exogène), serait plus élevée que celle de l'hydrocortisone marquée employée à dose traceuse (équivalente à l'hydrocortisone endogène) : 114 ± 6 minutes au lieu de 80 minutes (PETERSON et Coll.)

- après administration d'hydrocortisone ou de cortisone per os, le pic plasmatique des 17-hydroxycorticostéroïdes conjugués est quantitativement le même que celui observé après perfusion, et il apparaît dans le même temps (2^{ème} heure) (FIG N° 6). Il est par contre plus tardif, mais aussi plus durable, après injection intramusculaire, ce qui tend à prouver le caractère rapide et total de l'absorption de l'hydrocortisone par voie digestive.

II - ELIMINATION BILIAIRE ET CYCLE ENTERO-HEPATIQUE

L'élimination biliaire est vraisemblablement le départ d'un cycle entéro-hépatique, dont l'importance physiologique est diversement appréciée.

HYDE et WILLIAMS (I, 42) étudiant l'excrétion de l'hydrocortisone marquée administrée par voie veineuse, intramusculaire ou intragastrique chez des rats, ont montré que :

- plus de la moitié de l'hydrocortisone administrée quelle que soit la voie d'introduction, est retrouvée, dès les premiers jours dans les fèces, le reste passant dans les urines; 60 % de l'hydrocortisone marquée s'élimine par la bile en cas de fistule biliaire

- l'hydrocortisone est retenue dans l'organisme après hépatectomie

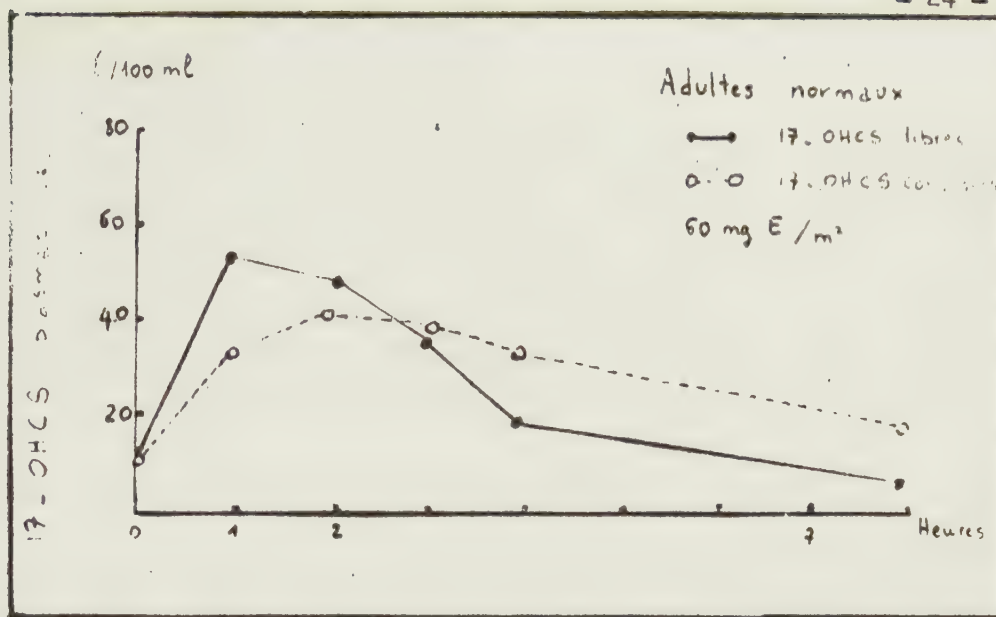


FIG N° 6 - Taux moyens des 17-OHCS plasmatiques libres et conjugués avant et après E orale chez 16 adultes normaux.

D'après KLEIN, PAPADATOS

Cette élimination serait rapide puisque 20 % au moins de l'hydrocortisone serait excrétée en quatre heures.

- en cas d'administration d'hydrocortisone marquée par tubage gastrique, la radio-activité des fèces devient presque nulle, témoignant de l'absorption quasi complète du stéroïde par la muqueuse intestinale.

- la radio-activité des fèces est plus élevée chez les rats témoins que chez ceux porteurs d'une fistule biliaire.

Autant d'arguments qui militent en faveur d'un cycle entéro-hépatique de l'hydrocortisone, et / ou de ses métabolites. WYNGAARDEN et PATERSON (1, 97) ont observé les mêmes faits chez le cochon d'Inde. Il semble en être autrement

chez l'homme.

PETERSON et coll (I, 58,60) utilisant, soit l'hydrocortisone libre (à raison de 50 à 500 mg en perfusion), soit l'hydrocortisone marquée, n'ont retrouvé, chez un sujet porteur d'une fistule biliaire, seulement que 4 % de la dose injectée, dans la bile; ces 4 % étant représentés presque uniquement par les métabolites conjugués de l'hydrocortisone. La présence d'une fistule biliaire fait disparaître la radio-activité des fèces (de l'ordre de 4 % en 4 jours).

Ainsi, la concordance quantitative de l'élimination biliaire et fécale, la disparition de cette dernière après fistule biliaire prouvent que la bile est la source essentielle, sinon la seule, des 17-hydroxycorticostéroïdes fécaux. L'existence d'un cycle entéro-hépatique est donc peu probable chez l'homme.

MIGEON et coll (I, 49) ont observé les mêmes résultats et concluent également que le cycle entéro-hépatique ne joue pas un rôle important chez l'homme. Bien plus, ils estiment que la majeure part des métabolites conjugués de l'hydrocortisone n'est ni excrétée dans la bile, ni réabsorbée par l'intestin mais directement rejetée dans le courant sanguin par les veines hépatiques.

La progestérone se comporte différemment, puisqu'elle est excrétée en majeure partie par la bile (60 %) WIEST, FUJIMOTO et coll (I, 96).

III - ELIMINATION FECALE

Nous avons déjà vu qu'elle était faible chez l'homme : 2 à 4 %, 9 % pour HELLMAN, quantitativement égale à celle de la bile. Elle disparaît après fistule biliaire. Alors que le suc gastrique et la bile ne dégradent pas l'hydrocortisone, les fèces la détruisent rapidement, en 4 heures environ (PETERSON).

IV - ELIMINATION URINAIRE ET CLEARANCE RENALE

a) Tous les auteurs utilisant les méthodes isotopiques s'accordent à reconnaître, qu'après administration d'hydrocortisone marquée, l'élimination urinaire est très importante et rapide :

- pour PETERSON et coll (I, 58), 80 % de la dose injectée est retrouvée dans les urines avant la 24ème heure, quelques % supplémentaires dans les deux jours suivants. Mais la moitié de l'excrétion totale est déjà éliminée vers la 4ème heure.

- pour HELLMAN et coll (I, 38), 85 % de l'hydrocortisone éliminée se retrouve sous forme de métabolites conjugués dans l'urine, dès la 4 ème heure.

- PLAGER et coll. (I, 62,63) donnent 75 %.

Les métabolites urinaires de l'hydrocortisone ont été bien étudiés par PETERSON et coll (I, 58)

- Il n'y a pratiquement pas d'hydrocortisone libre, moins de 1 %

- Les métabolites libres de l'hydrocortisone (formes hydrophénées, non conjuguées) comptent pour 4 %.

- Les glycu-conjugués de tétrahydrocortisone et tétrahydro-hydrocortisone essentiellement pour 60 % environ.

- Il reste 30 % de métabolites conjugués indéterminés, dont 15 % seraient probablement des sulfates ou d'autres conjugués (amino-acido-conjugués) et 15 % de métabolites inconnus, non hydrolysables par la α -glycuronidase, la sulfatase et l'acide à chaud.

Ces chiffres (85 à 90 % au total) sont donnés avec l'emploi de l'hydrocortisone marquée, alors que l'estimation chimique des chromogènes urinaires, par la réaction de PORTER-SILBER, ne permet de retrouver que 40 % de la dose injectée. Cette différence est due à la présence de certains stéroïdes PORTER-SILBER négatifs, à savoir :

• la 20 α -OH-hydrocortisone, éliminée sous forme libre,

• et les dérivés 20 α -OH de la tétrahydro-hydrocortisone, et de

la tétrahydro-cortisone, probablement conjugués en C_3 .

. et les 17-~~c~~stéroïdes oxygénés en 11 (SANDBERG (I, 7I, b).

La disproportion entre les quantités de 17-hydroxycorticostéroïdes conjugués et libres éliminées dans les urines n'est pas expliquée par leur différence de concentration dans le sang. Un mécanisme rénal intervient.

b) Clearances rénales .

BONGIOVANNI et EBERLEIN (I, 11) ont étudié la clearance des 17-hydroxycorticostéroïdes libres et conjugués, après administration per os de hautes doses de tétrahydro-cortisone (fonction alcool libre) à raison de 8 prises de 250 mg à 30 minutes d'intervalle chacune. Les clearances ont été mesurées sur trois périodes de 20 minutes en comparant les concentrations plasmatiques et urinaires des 17-hydroxycorticostéroïdes. Pour une clearance moyenne de la créatinine de 133 ml /minute, celle des 17-hydroxycorticostéroïdes libres est de 14,9 ml/minute, contre 94,5 ml/minute pour celle des conjugués.

Exprimées en pourcentage de la clearance de la créatinine prise pour l'unité, la clearance des corticoïdes libres serait de 11,2 % et celle des glycuco-conjugués de 71 %. (BONGIOVANNI et EBERLEIN).

On ne sait pas encore actuellement si cette différence entre la clearance des 17-hydroxycorticostéroïdes libres et celle des conjugués est due à une filtration glomérulaire plus lente des libres, ou à une réabsorption tubulaire différente.

Les chiffres publiés par BONGIOVANNI sont discutables. En effet, cet auteur a utilisé dans cette étude des doses énormes de tétrahydrocortisone, qui avaient élevé le taux plasmatique des 17-hydroxycorticostéroïdes au niveau record de 3 mg/100 ml. Dans ces conditions, il est tout à fait possible que les fonctions tubulaires, si elles interviennent dans l'élimination des stéroïdes, aient été débordées. D'autre part, cette étude ne concerne que la tétrahydro-cortisone libre et conjuguée. Il aurait été intéressant qu'elle portât sur l'hydrocortisone, puisque celle-ci représente le principal 17-hydroxycorticostéroïde du sang.

Le choix de la tétrahydro-cortisone pour l'étude des clearances est cependant judicieux, puisque ce stéroïde représente le principal métabolite urinaire des 17-hydroxycorticostéroïdes. Les études des courbes de décroissance radioactive plasmatique de différents stéroïdes ont montré que la di- et que la tétra-hydrocortisone disparaissent le plus vite du secteur plasmatique (ENGLERT). Cette vitesse de disparition accrue n'est qu'en partie due qu'à une clearance plus élevée : l'hydrocortisone doit être réduite puis conjuguée, avant d'être éliminée par le rein.

V - RECEPTEURS - POOL TISSULAIRE

Alors que la surrénale produit environ 25 à 30 mg d'hydrocortisone par jour, 5 à 7 seulement sont retrouvés dans les urines de 24 heures par la réaction de PORTER-SILBER. Ainsi, seulement le 1/4 de l'hydrocortisone produite par jour est éliminé dans les urines.

Indépendamment du fait qu'elle se dégrade partiellement en métabolites PORTER-SILBER négatifs, notamment en 17-cétostéroïdes oxygénés en 11, il existe certainement au niveau même des tissus récepteurs une autre voie d'élimination de l'hydrocortisone, pour rendre compte du destin des 2/3 environ de l'hydrocortisone, non éliminés par le rein.

Il est de plus difficilement pensable qu'au cours de son utilisation tissulaire, l'hydrocortisone ne subisse qu'une réduction et une conjugaison pour être ensuite éliminée par le rein. En tout cas, il ne semble pas y avoir de rupture du noyau A de la molécule, puisqu'après administration d'hydrocortisone marquée, on ne retrouve pas de carbone radio-actif dans le CO₂ expiré (HELLMAN et coll.)

Le devenir de l'hydrocortisone au niveau des tissus est mal connu. L'espace de diffusion lui-même est très variable selon les méthodes utilisées pour son estimation : de 12 litres en moyenne à 70 litres maximum. (PETERSON et coll I, 57). Le chiffre de 12 litres (8 à 17) déterminé par dilution isotopique est le plus vraisemblable, compte tenu du fait que celui de 70 litres équivaut au poids total du corps, et que des prélèvements

de muscle et de tissu graisseux notamment, ont montré leur faible teneur en hydrocortisone isotopique.

Mais il ne faut pas oublier que ce volume est plus virtuel que réel, étant donné que le pourcentage de 17-hydroxycorticostéroïdes liés aux protéines n'est pas le même dans le plasma et dans l'espace extra-vasculaire.

Le foie possède un taux élevé de 17-hydroxycorticostéroïdes - ce qui était prévisible étant donné son rôle important dans la dégradation des stéroïdes - où les libres et les conjugués sont en proportion à peu près égale comme dans le sang. (MIGEON et coll I, 49).

DAUGHERTY et coll ont également trouvé de l'hydrocortisone dans les fibroblastes et les mastcells. La concentration de l'hydrocortisone dans le secteur extra-vasculaire et intra-cellulaire est conditionnée en partie par la liaison stéroïde-protéine.

Nous avons vu que jusqu'à une concentration physiologique de 15 à 20 ug/100 ml, l'hydrocortisone est entièrement liée à une α -globuline. Dans quelle mesure cette liaison entrave-t-elle les échanges d'un espace à l'autre, aucune réponse n'a encore été donnée à cette question.

Ainsi, si le turn-over de l'hydrocortisone endogène est maintenant connu, son volume de diffusion ainsi que celui de ses métabolites, son éventuelle pénétration intra-cellulaire et ses formes de passage sont encore inconnues.

VI - HORMONES DE SYNTHÈSE

Le mystère qui entoure ainsi les voies cataboliques des 17-hydroxycorticostéroïdes apparaît nettement si l'on considère le devenir des hormones de synthèse. Comme certains auteurs l'ont déjà signalé, les composés Δ -1 dérivés des hormones naturelles (Δ -1-cortisone, Δ -1-hydrocortisone, Δ -1-94F-hydrocortisone) ne sont pratiquement pas conjugués. L'absence de conjugaison, donc d'inactivation, expliquerait pour une part leur activité

supérieure à celle des hormones naturelles (I, 75 a).

Comment dès lors rendre compte du métabolisme de ces hormones, puisque l'on constate qu'elles sont éliminées en quasi totalité sous leur forme presque originelle. VERMEULEN (I, 87) a retrouvé ainsi dans les urines un pourcentage important de la Δ -1-hydrocortisone administrée.

Les changements métaboliques liés à la création d'une deuxième liaison désaturée comportent aussi, contrairement à l'hydrocortisone et à la cortisone l'absence de transformation en 17-cétostéroïdes oxygénés en 11.

Ces modifications du comportement seraient liées pour DORFMAN et UNGAR à la deuxième liaison Δ -1 désaturée, qui s'opposerait à l'action de l'hydrogénase. Par contre, la cétone en 11 ne subit aucune influence, puisque la Δ -1-cortisone administrée est éliminée sous forme de Δ -1-hydrocortisone dans les urines.

De même que l'absence de réduction du groupe Δ 4-3 CO est peut-être due à la deuxième liaison désaturée, de même l'absence de conjugaison serait due à la non-réduction de ce groupement.

VII - TURN-OVER DE L'HYDROCORTISONE

Connaissant la production journalière de l'hydrocortisone, sa concentration plasmatique et sa demi-vie, plusieurs auteurs ont essayé de déterminer la vitesse de renouvellement de l'hydrocortisone.

Pour MORRIS et WILLIAMS (I, 52), BONDY et ALTROCK, le turn-over de l'hydrocortisone serait compris entre 26 et 40 minutes. PETERSON et WYNGAARDEN trouvent 47 minutes en moyenne (I, 57). Ce turn-over est beaucoup plus lent que celui de la plupart des autres stéroïdes, la progestérone (3,3 minutes). Bien des éléments déterminants de ce turn-over ne sont pas encore élucidés, telle l'utilisation tissulaire, par exemple.

CHAPITRE II

ETUDE ANALYTIQUE DU DOSAGE CHIMIQUE DES 17 HYDROXYCORTICOSTEROÏDES

I HISTORIQUE

Si le dosage des 17-hydroxycorticostéroïdes dans les urines est depuis longtemps entré dans la pratique, ce n'est que récemment qu'il a été mis au point pour le sang.

A - Les méthodes biologiques furent les premières proposées : (VOGT, PASCHKIS 1943; VENNING 1946; SELYE, SCHENKER 1948; DORFMANN 1946-1950 (II-13); NOBLE, SIMPSON TAIT 1952; SPIERS et MEYER 1951).

Elles sont pratiquement abandonnées actuellement, du fait de leur manque de précision et de spécificité.

B - Les méthodes physico-chimiques sont encore assez rarement utilisées, telles la fluorimétrie en milieu sulfurique (SWEAT, 1954 - II-61) ou la polarographie (MORRIS et WILLIAMS (1953 - II-40), étant donné qu'elles nécessitent, plus encore que les méthodes chimiques, une purification poussée des extraits plasmatiques.

C.- Les méthodes chimiques sont de loin les plus employées.

1) - Dès 1948, CORCORAN et PAGE (II-11) proposèrent une des premières techniques. Elle était basée sur l'oxydation, par l'acide périodique, de la chaîne latérale di-hydroxyacétonique en formaldéhyde. Le formaldéhyde libéré est alors mesuré par réaction avec l'acide chromotrope.

2) - En 1951, MADER et BUCK (II-36) mettent au point une méthode colorimétrique fondée sur la réduction du tétrazolum par le groupement α - céto - $\text{CO} - \text{CH}_2\text{OH}$ - avec formation du bleu de formazan.

Ces deux méthodes ne dosent pas seulement les 17-hydroxycorticostéroïdes mais des stéroïdes réducteurs α - céto en général, à savoir notamment les 17-désoxycorticostéroïdes, c'est-à-dire la corticostérone (composé P),

ses précurseurs et ses dérivés et même l'aldostérone.

En 1950, PORTER et SILBER (II-49) mettent au point la réaction qui porte leur nom et qui constitue un pas décisif dans l'étude des 17-hydroxycorticostéroïdes. En effet, le phénylhydrazine en milieu sulfurique concentré donne avec les 17-hydroxycorticostéroïdes une coloration jaune, avec un pic d'absorption spécifique à 410 mμ.

La réaction colorée propre aux 17-hydroxycorticostéroïdes découverte, les auteurs vont s'attacher surtout au problème de la purification des extraits plasmatiques.

NELSON et SAMUELS en 1952 (II-43) proposent ainsi l'adsorption sur colonne de Florisil pour purifier les extraits. Leur méthode demeure encore actuellement la plus sûre et la plus précise, mais elle nécessite une technique rigoureuse.

En 1953, BAYLISS et STEINBECK (II-2_a) sensibilisent la méthode de NELSON et SAMUELS.

SILBER et PORTER en 1954, (II-58_a et b) désirant répondre aux besoins de la routine clinique, adoptent une procédure simplifiée, inspirée de leur technique de dosage dans les urines, ne comportant pas notamment de purification ~~sur colonne~~ de Florisil.

En 1956, SILBER et BUSCH modifient la précédente technique en y ajoutant le lavage des extraits plasmatiques par certains solvants organiques (II-59_a et b).

En 1957, WEICHSELBAUM et MARGRAF (II-69) associent la technique de SILBER et PORTER à celle de MADER-BUCK pour doser par différence les seuls 17-désoxycorticostéroïdes. La même année, ils mettent au point une nouvelle méthode basée sur les propriétés réductrices de la chaîne dihydroxy-acétonique vis-à-vis de l'I.N.H. (II-69_b).

Toutes ces méthodes concernaient surtout les 17-hydroxycorticostéroïdes libres.

BONGIOVANNI et EBERLEIN les premiers (I-10,11) utilisent la βglycuronidase bactérienne pour doser les corticostéroïdes conjugués. Les corticostéroïdes libérés par cet enzyme sont alors traités selon la méthode de NELSON et SAMUELS.

WEICHSELBAUM, MARGRAF et d'autres auteurs (I-97) par la suite abandonnent l'hydrolyse acide au profit de l'hydrolyse enzymatique.

II GENERALITES

Comparé à celui des stéroïdes urinaires, le dosage des stéroïdes sanguins accumule les difficultés inhérentes "au milieu", à savoir notamment :

- quantité de stéroïde beaucoup plus petite, de l'ordre de $1 \mu g$ environ pour une prise d'essai de 10 ml et non 50 fois plus comme pour le même volume d'urine, (Tableaux n^{os} 3 et 4);
- Présence de lipides différents des stéroïdes mais dont la solubilité dans les solvants organiques est parfois voisine;
- Présence de protéines, dont la liaison avec les stéroïdes est encore actuellement controversée dans ses modalités et sa signification.

:	:	:	:
: CORTICOSTEROÏDES :	URINES :	SANG :	:
:	:	:	:
: <u>Corticostéroïdes</u> :	<u>1</u> :	<u>1</u> :	:
: Extrait sec. :	1200 :	700.000 :	:
:	:	:	:
: <u>Corticostéroïdes</u> :	----- :	<u>1</u> :	:
: Fraction lipidique :	:	76.000 :	:
:	:	:	:

TABEAU N° 3 - Concentrations comparées des corticostéroïdes par rapport aux fractions "solides" et "lipides" du sang et de l'urine.

- d'après R. BORTH -

	Concentration dans les urines mg/l	Concentration double sérum µg/ml
Extrait sec total	60000	50000
Lipides totaux	---	5300
Cholestérol	---	2000
Créatinine	1000	10
Corticostéroïdes	5	0,07

Tableau N° 4 - Concentrations respectives des corticostéroïdes et de certains constituants de l'urine et du sérum.

- d'après R. BORTH -

III LES ETAPES DU DOSAGE DES 17-HYDROXYCORTICOSTEROIDES

Ce dosage comprend plusieurs étapes :

- A - Prélèvement
- B - Extraction
- C - Purification
- D - Evaporation
- E - Dosage photométrique
- F - Calcul des résultats.

Chacun de ces stades pose des problèmes techniques d'inégale difficulté. Il faut d'emblée insister sur l'importance de la propreté du matériel et sur celle de la pureté des réactifs.

A - PRELEVEMENT.

Le sang sera prélevé sur héparine : 1 mg/10ml, (NELSON et SAMUELS II -43) ou une goutte. Le dosage se fait sur le sang total ou bien sur le plasma.

Dans ce dernier cas, le sang doit être centrifugé dans la 1/2 heure qui suit le prélèvement et le plasma recueilli à part, afin de prévenir un éventuel passage des stéroïdes dans les globules rouges (NELSON et II-43).

L'emploi de l'héparine est préférable à celui du citrate car ce dernier donne un "trouble" au moment de la réaction finale. Ce trouble est vraisemblablement dû à des traces de calcium entraînées à travers le solvant par la citrate. Le calcium précipite alors sous forme de sulfate de calcium au contact de l'acide sulfurique fort. (NELSON et SAMUELS).

La durée de conservation en glacière du sang ainsi prélevé est très difficilement estimée selon les auteurs. Pour BLISS (I-5), ENGEL (I-33, 34), GEMZEL (II-19) et MIGEON (II-39), elle n'excède pas quarante-huit heures.

KASSENAR et coll. estiment au contraire que si le plasma est conservé dans un "deep freezer", elle peut atteindre plus d'une semaine. HARWOOD et MASON n'observent pas de différence dans les dosages plasmatiques après 15 jours de conservation en glacière et pensent que le plasma reste stable ainsi 9 semaines.

Sans être ^{aussi} optimistes, nous estimons, avec BUSH (II-5_c), qu'il peut être conservé 4 semaines sans inconvénient.

Etant donné les variations importantes du taux sanguin des 17-hydroxycorticostéroïdes en fonction du ryc+hémère, il est souhaitable d'effectuer les prélèvements à heure fixe, de préférence le matin, puisque la sécrétion maximum de ces stéroïdes paraît se situer entre 6 et 8 heures, et d'en noter l'heure.

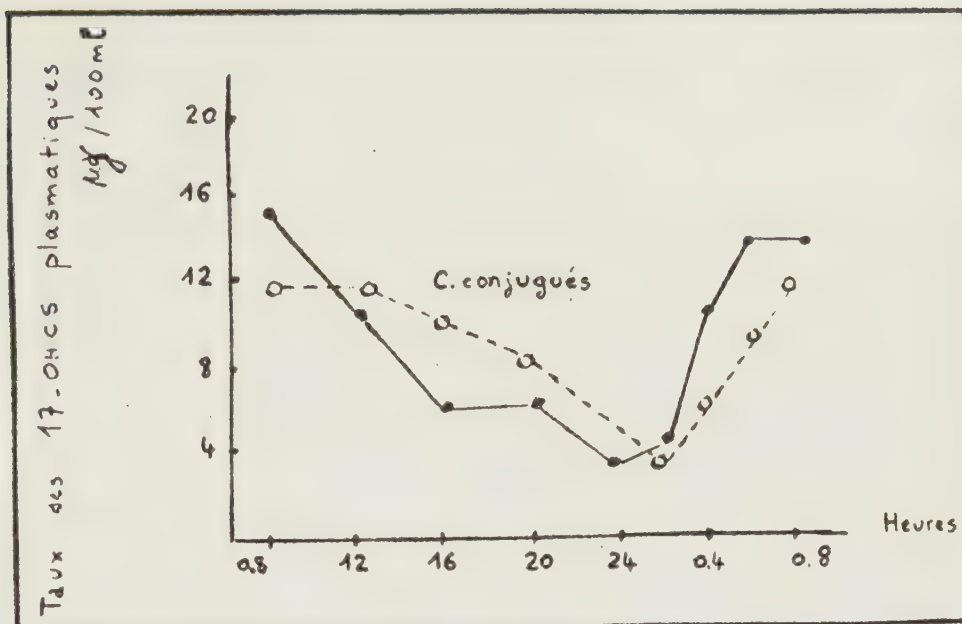


FIG. N° 7 - Variations journalières du taux des 17-OHCS libres et conjugués dans le plasma en fonction de l'heure.

- d'après BROWN et coll. -

La quantité de plasma utilisée est habituellement de 10 ml (NOLSON et SAMUELS II-43, SILBER, PORTER II-58,59), plus rarement 5 ml (PETERSON II-48) ou 4 ml (VAN der VIES II-65).

B - L'EXTRACTION

Elle sera différente selon que l'on désire doser les 17-hydroxycorticostéroïdes totaux ou seulement leur fraction libre ou conjuguée.

I - 17-HYDROXYCORTICOSTEROÏDES LIBRES

a) - LE CHOIX DU SOLVANT sera conditionné par 2 propriétés essentielles du solvant : d'une part son pouvoir extracteur vis-à-vis des stéroïdes, pouvoir variable d'un stéroïde à l'autre, et d'autre part ses possibilités de purification.

Le tableau suivant, emprunté à SILBER et PORTER donne une idée du pouvoir extractif de différents solvants en fonction du stéroïde considéré.

:	:Chloro- :forme*	:Acétate :d'éthyle*	:Benzène* :	:Tétra- :Chloru- :re de :carbone:	:Ether de :pétrole*	:Chlorure :de méthylène*	:
:Cortisone	: 0.027	: 0.057	: 0.9	: 30	: au delà de	: 500	: 0.033
:F	: 0.14	: 0.078	: 2.7	: 120	: " "	: 500	: 0.09
:THE	: 0.12	: 0.048	: 3.3	: 75	: " "	: 500	: 0.065
:THF	: 0.57	: 0.073	: 7.9	: 250	: " "	: 500	: 0.4
: ⁶¹ E	: 0.048	: 0.072	: 1.3	: 60	: " "	: 500	: 0.042
:9 α -Fluoro F	: 0.23	: 0.042	: 3.7	: 265	: " "	: 500	: 0.21
:Composé B	: 0.005	: 0.055	: 0.08	: 0.75	: 190	:	: 0.0065
:Testostérone	: <0.01	: <0.01	: <0.01	: 0.03	: 0.036	: <0.01	:
:Progestérone	: <0.01	: <0.01	: <0.01	: 0.02	: 0.01	: <0.01	:
:Androstenedione	: <0.01	: <0.01	: 0.01	: 0.056	: 0.047	: <0.01	:
:	:	:	:	:	:	:	:

* Réactifs Merck (non redistillés)

TABLEAU N° 5 - Coefficients de partage des stéroïdes entre eau et solvants.

- d'après SILBER et PORTER -

1) Le chloroforme a été jusqu'à présent le plus employé, mais il doit être fraîchement redistillé sur CO₂K₂, immédiatement avant l'emploi, sa stabilité n'excédant pas quelques jours à quelques semaines maximum. En l'absence de redistillation, le phosphogène qu'il contient serait capable, pour certains auteurs,

de détruire les stéroïdes.

Ces précautions pourtant adoptées par la très grande majorité des expérimentateurs ne sont peut-être pas indispensables : CERESA et CRAVETTO, dans leur méthode récemment proposée, (II-7), utilisent le chloroforme MERCK, pour analyse, sans distillation préalable, qui paraît leur donner toute satisfaction.

2) Le chlorure de méthylène a d'indéniables avantages sur le chloroforme :

- pouvoir extracteur nettement supérieur à celui du chloroforme vis-à-vis de l'hydrocortisone, de la tétrahydrocortisone, voisin pour la cortisone et pour la tétrahydrocortisone et la Δ 1-cortisone, comme le montre le tableau de PORTER et SILBER.

- stabilité accrue : purifié par passage sur un gel de silice, il peut être conservé à la température du laboratoire pendant plusieurs mois (PETERSON II-48).

A partir du dichlorométhane technique, produit assez grossier, la méthode de purification que nous avons adoptée (cf additif p. I), d'exécution rapide et facile, assure une purification remarquable et stable : le dichlorométhane peut se conserver ainsi sans altération pendant deux mois au moins. (cf tableau n° 12).

- point d'ébullition inférieur.

- absence d'émulsion avec le réactif de PORTER et SILBER.

Pour toutes ces raisons, nous avons adopté le dichlorométhane.

3) L'acétate d'éthyle, difficile à purifier, miscible avec le réactif de PORTER, est de ce fait peu utilisé.

4) Quant au butanol, quelle que soit la technique proposée, il est impossible de le purifier complètement. Son point d'ébullition élevé (+116°) rend son évaporation difficile. Il donne enfin des résidus non négligeables.

Cependant, BROWN et coll. ont proposé une technique

un peu différente de celle de REDDY (II-51, 52), qui leur donne toute satisfaction.

En définitive, les deux meilleurs solvants pour l'extraction des 17-hydroxycorticostéroïdes libres sont le dichlorométhane et le chloroforme.

- b) - QUANTITE DE SOLVANT : 3 à 5 volumes de solvant pour un volume de plasma sont nécessaires pour extraire la totalité des stéroïdes. Ainsi, avec 50 ml de dichlorométhane pour 10 ml de plasma, l'hydrocortisone est extraite à 98% (NELSON et SAMUELS II-43).

L'extraction peut être menée en une fois, mais il est préférable de faire 2, voire 3 extractions successives (HARWOOD et MASON II-22).

Pour ces auteurs, au niveau de 4 µg d'hydrocortisone/10 ml de plasma, un gain de 6% seulement est réalisé pour plus d'une extraction.

Il semble ainsi què, pour un sang normal, 2 extractions successives avec 1,5 volume de solvant pour un volume de plasma permettent une extraction quasi quantitative (de l'ordre de 92 à 95%) des 17-hydroxycorticostéroïdes présents. Une troisième extraction identique, constitue plus une sécurité supplémentaire mais non indispensable, qu'un gain réel. Si l'on songe que pour un sang normal contenant environ 10 µg de 17-hydroxycorticostéroïdes/100 ml, le gain conféré par plus de 2 extractions, ou par plus de 3 volumes de solvant pour 1 volume de plasma - ce qui revient au même - est de 6% environ, soit 0,06 µg de 17-hydroxycorticostéroïdes pour la prise d'essai, ce gain est vraiment très minime et paraît très compromis par les artefacts que de grandes quantités de solvants, même purifiés, peuvent créer.

Ce n'est que dans les cas où l'on prévoit une concentration importante de stéroïdes (de l'ordre de 50 µg/100 ml, STRESS, test à l'ACTH IV, administration des corticoïdes exogènes par exemple) qu'il est prudent de faire une 3ème extraction.

- c) - LA DUREE de l'extraction obtenue par une agitation sans brutalité des tubes à centrifuger munis de bouchons rodés (ou de couvercles en

plastique), est variable selon les auteurs : SILBER et PORTER proposent 20 à 30 secondes, PETERSON (II-48), 5 à 10 minutes.

- d) - PH : si l'extraction par le butanol soit se faire à PH 1, le pH d'extraction semble indifférent lors de l'emploi des autres solvants.
- e) - CENTRIFUGATION : L'extraction terminée, la phase organique est recueillie après une centrifugation de durée également variable : 30 minutes pour BAYLISS et coll. avec le chloroforme, 5 minutes pour REDDY et coll. avec le butanol.

SILBER et BUSCH (II-59) signalent qu'une émulsion s'observe parfois avec le dichlorométhane. Il est possible de rompre l'émulsion soit, comme le préconisent SILBER et BUSCH en congelant la phase aqueuse au moyen d'un mélange réfrigérant, soit en centrifugeant à 6000 tours, ce qui est souvent suffisant.

Une agitation douce, au moment de l'extraction, nous permet en règle d'éviter la formation d'une émulsion. PETERSON (II-48), dans le même but, extrait le plasma sur ~~extracteur~~ rotatif (ARTHUR. H. THOMAS Co n° 3623) qui évite un mélange violent et permet ainsi de récupérer le solvant sans centrifugation.

On pourrait à la rigueur utiliser des allonges comme celles employées pour les urines, mais il faudrait augmenter considérablement le temps de l'extraction proprement dite.

Il est difficile d'évaluer avec certitude la qualité de l'extraction en déterminant par exemple le pourcentage de récupération de l'hydrocortisone ajoutée au plasma, car les différents temps opératoires du dosage sont plus ou moins responsables d'une perte en stéroïdes, voire d'erreurs par excès comme le montre le tableau n° 6 . établi par NELSON et SAMUELS. Ces auteurs trouvent, en effet, des pourcentages de récupération allant de 55 à 132%, valeurs extrêmes. Nous reviendrons sur ces faits.

LOMBARDO et coll. (II-33, 34) proposent une extraction associant la dialyse du sérum (Sang-eau-méthanol v/v/v - phase intérieure) contre le méthanol (soit aqueuse à 60%, phase extérieure) et l'extraction continue pendant 48 heures par le chlorure de méthylène redistillé, - dans un extracteur HERSHBERG-WOLFE.

Le chlorure de méthylène est évaporé à sec et repris pour être chromatographié selon BURTON modifié par ROMANOFF.

Cette méthode aurait, selon ses promoteurs, les 3 avantages suivants :

- manipulation réduite
- les extraits sanguins sont bien épurés des graisses, cholestérol et pigments.
- la récupération des stéroïdes et la reproductibilité sont satisfaisantes. La récupération des différents 17-hydroxycorticostéroïdes, de la corticostérone, mais aussi de la testostérone, de l'androstène-dione et de la 11-hydroxy-étiocholanolone s'échelonnerait entre 84 et 103% pour des concentrations comprises entre 0,5 et 2 mg %.

Il est surprenant que ces auteurs aient utilisé des doses de stéroïdes 50 à 200 fois supérieures, pour les 17-hydroxycorticostéroïdes, à celles observées physiologiquement dans le plasma.

Si cette méthode paraît satisfaisante pour des concentrations énormes de 17-hydroxycorticostéroïdes, rarement observées à ce taux en clinique, rien n'autorise à supposer qu'elle soit assez sensible pour des taux normaux de stéroïdes.

II - 17-HYDROXYCORTICOSTEROÏDES CONJUGUES

Ils peuvent être extraits de 4 façons :

- a) - PAR LE BUTANOL : Celui-ci d'ailleurs, n'extraît pas exclusivement les 17-hydroxycorticostéroïdes libres, mais aussi les conjugués. Il permet ainsi le dosage des 17-hydroxycorticostéroïdes totaux.

Tel est le principe de la méthode de REDDY et coll.
(II-52) 10 ml de butanol agités pendant 5 minutes avec 5 ml de plasma préalablement déprotéiné (par SO_4Zn à 10% et NaOH 0,5 N) permettraient, selon ces auteurs, de récupérer de 96 à 120% de la cortisone libre ajoutée et de 92 à 106% d'un 17-hydroxycorticostéroïde conjugué.

Là encore, ces pourcentages de récupération supérieurs à 100% sont notés.

Nous avons mentionné déjà les difficultés d'emploi du butanol.

- b) - LE MELANGE ETHER-ALCOOL 3:1 préconisé par EDWARDS, KELLIE et WADE (II-15) pour le dosage des stéroïdes conjugués urinaires, extrait comme le butanol les corticoïdes libres et conjugués à condition de se placer en milieu saturé à 50% en sulfate d'ammonium. Le pH auquel doit se faire l'extraction semble indifférent : le plus souvent, il est de 5,6 environ.

Cette technique semble n'avoir jamais encore été appliquée à l'extraction des 17-hydroxycorticostéroïdes conjugués du plasma. Certes, elle paraît séduisante, d'exécution rapide, et ne présente pas certains inconvénients du butanol. Elle permet également le dosage direct des 17-hydroxycorticostéroïdes conjugués (en faisant réagir le réactif de PORTER-SILBER directement sur le mélange éther-alcool évaporé à sec, sans avoir recours à l'hydrolyse enzymatique).

Mais nous n'avons pu, jusqu'à présent, purifier assez solvants et extraits pour éliminer les chromogènes parasites et assurer la validité de la réaction finale. En effet, après extraction plasmatique, le mélange éther-alcool évaporé à sec donne, en présence du réactif de PORTER-SILBER, comme du réactif "Blanc", une coloration rose-brune importante qui rend tout dosage impossible.

Il est possible d'éliminer une bonne partie du sulfate d'ammonium présent dans l'extrait sec en reprenant celui-ci par l'éthanol absolu et en filtrant la solution éthanolique sur de la laine de verre très pure, préalablement traitée par l'éthanol.

Si ce procédé ne paraît pas causer de perte notable de stéroïde, il ne constitue pas un moyen de purification suffisant.

L'emploi d'une colonne de florasil permettrait vraisemblablement de faire disparaître les substances parasites chromogènes et lipides notamment, entraînées par le mélange de EDWARDS-KELLIE lors de l'extraction plasmatique.

Nous ne l'avons pas essayé.

- c) - D'autres solvants ont été proposés. BUSH (II,5_b) estime que le tétrahydrofurane et le butanol extraient mieux les corticoïdes conjugués que le mélange éther-alcool.
- d) - HYDROLYSE : C'est la méthode la plus couramment employée. On hydrolyse le plasma préalablement débarrassé ou non des 17-hydroxycorticostéroïdes libres.

L'hydrolyse va "libérer" les stéroïdes conjugués, qui pourront alors être extraits par un des solvants des stéroïdes libres déjà cités, et finalement dosés.

1) Tous les auteurs sont actuellement d'accord pour abandonner l'hydrolyse acide, autrefois proposée par KLEIN, PAPADATOS, FORTUNATO, BYERS (II-26) au profit de l'hydrolyse enzymatique, et ceci pour deux raisons :

- pouvoir hydrolysant faible
- production importante d'artefacts

En effet, alors que l'hydrolyse acide ne libère guère plus de 5 à 30% des stéroïdes conjugués (à pH 1, avec extraction immédiate ou après 4 heures), l'hydrolyse avec la β -glycuronidase libère 93 à 102% de monoglycuronide de tétrahydrocortisone en solution aqueuse pour des taux compris entre 0,7 et 104 $\mu\text{g}/10\text{ ml}$ (BIOGIOVANNI, I-10).

2) L'hydrolyse enzymatique est assurée par la β -glycuronidase pure, bactérienne ou animale. En effet, comme l'ont souligné VLIERS et coll. (II-68_a), le suc total d'escargot contenant à la fois glycuronidase et sulfatase donne une réaction parasite avec le réactif de PORTER-SILBER, (équivalente à 0,4 μg de cortisone). Cet artefact n'existe pas avec la β -glycuronidase pure.

Deux faits méritent d'être notés :

α - Le pouvoir hydrolysant de la β -glycuronidase pure paraît limité. La récupération du monoglycuronide de tétrahydro-cortisone ajouté au plasma est de 80 à 105% pour des quantités allant de 0,7 à 10 $\mu\text{g}/10\text{ml}$.

Mais ce pourcentage tombe à 50% environ en cas de concentration plasmatique élevée en stéroïdes conjugués de l'ordre de 100 $\mu\text{g}/10\text{ ml}$, condition rarement rencontrée en clinique, il est vrai (BONGIOVANNI, I-9,10,11).

Cette diminution de la récupération n'est pas due seulement à l'insuffisance, qualitative ou quantitative, de la β -glycuronidase, mais également à celle de l'extraction : la multiplication du nombre des ~~extra~~ctions par le dichloro-méthane améliore le rendement.

β - Il existe vraisemblablement dans le sang total des inhibiteurs de cet enzyme.

On peut éviter cette inhibition de plusieurs façons :

- soit, en ajoutant la β -glycuronidase au plasma par doses réfractées, WEICHSELBAUM et MAGRAF (II-69_a) emploient ainsi 4 fois 750 unités de β -glycuronidase à une heure d'intervalle.

- soit en utilisant un chélateur du type acide éthylène-diamine-tétracétique (EDTA) dont le mode d'action paraît complexe.

- soit en pratiquant l'hydrolyse non pas sur le sang total ni le plasma, mais sur un extrait aqueux déjà purifié (BIOGIOVANNI I-9,10,11).

- soit enfin en utilisant un "activateur" de la β -glycuronidase. Ces activateurs paraissent très nombreux puisque des corps aussi différents que les α -amino-acides, le chloroforme, le monosulfure de sodium, le versène, la 8-hydroxyquinoleine, la cystéine semblent posséder ce pouvoir.

En fait, ce ne sont pas à proprement parler des "activateurs" de la β -glycuronidase, mais plutôt des anti-inhibiteurs de cet enzyme.

DOYLE et coll. (II-14) ont montré le pouvoir inhibiteur :

- total du Cu^{++} , Hg^{++} , Ag^{+} aux concentrations respectives de 1×10^{-4} M, 1×10^{-7} M, 1×10^{-6} M
- partiel du Ni^{++} , Sn^{++} , Zn^{++}
- nul de Al^{+++} , Fe^{+++} , Sn^{++++}

Or, ces inhibiteurs seraient à leur tour "inhibés" par les agents dits "activateurs" dont le mode d'action n'est pas univoque.

Ainsi, le versène, les α -amino-acides, agiraient comme agents chélateurs.

La cystéine inverse l'action du Cu^{++} et du Hg^{++} , de l'Ag par deux mécanismes possibles : pouvoir réducteur de son groupement, SH et effet chélateur.

La β -glycuronidase possède un groupement SH bloqué par le chloro-mercuro-benzoate et libéré par la cystéine. Un phénomène compétitif intervient entre ces 2 corps, au profit de la

β -glycuronidase.

Ainsi l'emploi de chélateurs ou de composés porteurs d'un groupement SH est très recommandé pour bloquer les inhibiteurs de la β -glycuronidase, DOYLE et coll. (II-14).

γ - La dose optimum de β -glycuronidase à employer a été déterminée par tâtonnements, du fait notamment des éventuels inhibiteurs.

Après avoir préconisé l'emploi de doses de l'ordre de 1000u/ml, BONGIOVANNI et coll. (I-9,10,11) utilisent 300 à 500 unités Fishman/ml de substrat à 37°, pendant 48 heures, après addition de tampon acétate (0,1 M pH 4,5) *.

Avec des doses supérieures à 1000 unités par ml, le pourcentage de stéroïde retrouvé est plus faible (75%) : ce fléchissement apparent de l'activité enzymatique semble dû à la libération, par l'enzyme, de chromogènes parasites (BONGIOVANNI).

WEICHSELBAUM et MARGRAF (II-69_a) emploient une glycuronidase bactérienne^{xx} à raison également de 300 u/ml de plasma et ils ajoutent 0,5 ml d'une solution aqueuse d'acide éthylène-diamine-tétracétique, avant l'incubation à pH 6,5 - 6,8 pendant 4 heures.

Nous avons employé la β -glycuronidase d'escargot (*Helix-Pomatia*) purifiée à partir de suc total (JARRIGE et HENRY: II²) selon la méthode de Madame A. ALFSEN (V-1). La technique de purification est longue et délicate, mais elle permet d'obtenir un produit d'un prix de revient modique, titrant environ 12000 à 15000 U.F./ml de solution. Son activité est environ 3 à 5 fois moindre que celle de la β -glycuronidase bactérienne ou animale. Des doses de l'ordre de 1500 U.F./ml de substrat seraient théoriquement nécessaires si l'on prend comme base de référence la β -glycuronidase bactérienne.

δ - La conservation de la β -glycuronidase n'est, en général, pas mentionnée. Il est prudent, lorsque le lot utilisé est ancien,

* β -glycuronidase : KETODASE-WARNER, CHILCOTT, NEW-YORK 45° C

^{xx} β - glycuronidase bactérienne : SIGMA CHEMICAL Co SAINT-LOUIS, MISSOURI - U.S.A.

d'en vérifier l'activité enzymatique.

La β -glycuronidase d'escargot purifiée ne se conserve pas plus de trois semaines en glacière.

En définitive, les avantages de l'hydrolyse enzymatique sont évidents, mais il faut connaître les limites de ce procédé.

Seuls, les corticoïdes glycuro-conjugués sont actuellement correctement hydrolysés. Or, il existe, semble-t-il, de multiples modes de stéroïdo-conjugaison. EADES et coll. (I-31) auraient notamment isolé un stéroïde-amino-acido-conjugué dans les urines (stéroïde + glycine). De même, un phosphate de D.H.A. a été découvert dans le sang (I-54).

En ce qui concerne les sulfo-conjugués, ils peuvent être hydrolysés par le suc total d'escargot. Mais ce suc donnerait des artefacts.

En fait, toutes ces autres variétés de stéroïdes conjugués ne constituent qu'une faible part des 17-hydroxycorticostéroïdes conjugués comparées aux glycuroconjugués.

Leur hydrolyse spécifique, de ce fait, présente à priori moins d'intérêt. Il n'est pas impossible cependant que certaines de ces fractions de stéroïdes conjugués ne subissent des modifications significatives dans certaines conditions pathologiques.

Bien que l'existence d'inhibiteurs plasmatiques n'ait été formellement démontrée, il est préférable de pratiquer l'hydrolyse sur un milieu purifié plutôt que sur le plasma brut.

L'altération par vieillissement de la β -glycuronidase nécessite des vérifications fréquentes de son pouvoir glycuronidasique.

L'emploi de hautes doses d'enzyme, en cas de concentration plasmatique élevée en stéroïdes, risque de créer des artefacts (BONGIOVANNI I-9,10,11).

C - PURIFICATION

Elle constitue un des temps essentiel du dosage des corticoïdes plasmatiques. En effet, quel que soit le solvant employé, les lipides plasmatiques passent, comme les stéroïdes, dans la phase organique. Ils donnent, particulièrement après évaporation du solvant, un résidu important, qui fausse complètement la réaction de PORTER-SILBER. De plus, des substances chromogènes parasites en quantité plus ou moins grande, colorent les extraits et peuvent même donner une réaction de PORTER-SILBER authentique.

Bien plus, le réactif "Blanc" à lui seul donne parfois, en présence de substances organiques présentes dans l'extrait, des valeurs de "témoins" élevées (MASON II-38).

Il en résulte que l'absorption propre du stéroïde en présence de phenylhydrazine est représentée par la petite différence comprise entre 2 densités optiques élevées.

De fait, il a été rapporté, parfois, que la valeur des "témoins" excédait celle des "dosages" (MASON II-38), (WEICHSELBAUM II-69_a).

On peut ainsi dire que la précision et la sûreté du dosage dépendent du degré de pureté des extraits.

Les techniques de purification peuvent être appliquées au plasma lui-même, à l'extrait chloroformique ou dichlorométhanolique.

I - LAVAGE

- a) - UN SOLVANT NON POLAIRE entraînera certains lipides ou pigments, les oestrogènes, d'autres stéroïdes, d'éventuelles médications.

Les solvants les plus utilisés à cet effet sont l'hexane, le tétrachlorure de carbone et l'éther de pétrole. Ils ont été choisis en fonction notamment de leur coefficient de partage élevé vis-à-vis des 17-hydroxycorticostéroïdes (cf. tableau N° 5).

Ce lavage est préconisé par SILBER et BUSCH (II-59) avant toute extraction : deux lavages (1,5 v. de solvant/1 v. de plasma), le premier avec du tétrachlorure de carbone, le deuxième avec de l'éther de pétrole.

Un seul lavage ^{peu} peut suffire, si le plasma paraît ^{peu} lipémique, ou si seuls des médicaments non solubles dans les solvants organiques ont été administrés au patient.

L'hexane serait peut-être mieux approprié : sa densité faible lui permet de surnager, ce qui facilite son rejet.

Ces différents lavages permettraient d'éliminer certains chromogènes parasites tels l'iodure de potassium, l'hydrate de chloral, la paralaldéhyde, la colchicine.

En fait, le bénéfice d'un tel lavage nous a paru le plus souvent/^{plus} théorique que réel. Le résidu lipidique est pratiquement nul après évaporation du solvant, et les valeurs des témoins plasmatiques avec ou sans lavage sont identiques.

Aussi, n'avons-nous pas inclu ce type de lavage dans notre technique de dosage.

- b) - UNE SOLUTION SODIQUE constitue un excellent moyen de lavage. Le nombre de lavages, comme la quantité de soude utilisée, varient considérablement selon les auteurs :

1 lavage avec 1 ou 2 ml de NaOH, 0,1 N }
2 lavages avec 4 ou 2 ml de NaOH, 0,1 N } pour 10 ml d'extrait,
le temps de lavage étant de l'ordre de 15 secondes.

SILBER-BUSCH soulignent que l'augmentation de la quantité de NaOH, de la concentration de la soude, ou le multiplication des lavages ne donnent pas un gain appréciable dans la purification, et ceci pour une perte accrue et non négligeable de stéroïdes.

Celle-ci serait pour ces mêmes auteurs de l'ordre de 20%.

II - LA DEFECATION DU PLASMA

- a) - Elle constitue aussi bon moyen de purification et peut se faire :

- 1) - Avec une solution de SO_4Zn à 10% et de NaOH 0,5 N en proportions telles que toute le soude soit utilisée à précipiter l'hydroxyde de zinc formé.

D'après REDDY et coll. (II-52), ses promoteurs, cette méthode n'entraînerait pas de perte importante de stéroïde. REDDY a recouvré ainsi de 94 à 110% de la cortisone ajoutée au plasma avant la précipitation protidique.

Cette défécation nous semble insuffisante : le surnageant n'est ni limpide, ni incolore. Il demeure, en effet, dans le

surageant une quantité appréciable de protéines.

Aussi avons-nous essayé une solution de SO_4Zn à 20% et de NaOH N. La défécation est alors plus poussée, le surageant limpide est presque incolore. La quantité de protéines résiduelles est tout à fait minime.

Mais une telle défécation entraîne une perte de stéroïde importante, de l'ordre de 40% environ si l'on ne prend pas soin de laver le précipité protéique, non négligeable encore malgré cette précaution.

De plus, l'utilisation du SO_4Zn n'est peut-être pas souhaitable si l'on désire faire ensuite une hydrolyse avec la β -glycuronidase. Il est bien improbable que la soude précipite tout l'hydroxyde de zinc : une inhibition de la β -glycuronidase est donc à craindre.

Pour ces deux raisons, nous avons renoncé à l'emploi de ce mode de défécation.

b) - Avec l'éthanol à 95% en proportions variables :

2,5 v/v de plasma pour BONGIOVANNI (I-10,11)

2 v " " " CERESA (II-7)

3 v " " " MORRIS (II-40).

La défécation doit être menée avec précaution en versant le plasma goutte à goutte dans l'éthanol, et en n'agitant qu'après précipitation complète. Il est également recommandé de laisser l'éthanol au contact du plasma pendant plusieurs heures.

L'éthanol aurait le triple avantage de :

- cliver les cénapses lipidoprotidiques.
- permettre la conservation du plasma avant tout autre traitement.
- ne pas entraîner de perte de stéroïde importante :
BONGIOVANNI l'estime à 1,2% pour les 17-hydroxycorticostéroïdes libres et 2% pour les conjugués.

BONDY et ALTROCK (I-7) emploient le mélange éthanol-éther 3/1 à raison de 20 volumes pour un volume de plasma.

c) - En fait, il est difficile d'apprécier exactement la perte de stéroïdes imputable à la défécation, étant donné que ni le pourcentage exact de stéroïdes ~~libres~~ ou conjugués - fixés aux protéines,

ni la qualité de cette liaison stéroïde-protéine ne sont vraiment connus.

Il est également difficile de définir dans quelle mesure cette liaison stéroïde-protéine entrave l'extraction totale des stéroïdes par les solvants organiques habituels.

Les mélanges alcool-éther ou alcool-acétone seraient parmi les plus efficaces.

Pour DEVIS et coll. (I-28), DE DUVE (in I-28), la trypsine et la papaïne en digérant les protéines, libèreraient mieux les stéroïdes : en effet, les procédés habituels de défécation précipitent les protéines, et ainsi, les stéroïdes, même une fois libérés de leur attache protidique sont plus ou moins emprisonnés dans le précipité protéique.

De toutes façons, les glycérides qui ne sont pas habituellement liés aux β -globulines, passent facilement dans le surnageant.

III - LES PROCÉDES D'ADSORPTION

a) - L'ADSORPTION SUR COLONNE

Elle constitue certainement le meilleur procédé de purification. Elle peut se réaliser :

1) - Soit avec le silicate de magnésium-célite. La colonne de 11 mm de diamètre intérieur est remplie de silicate sur une hauteur de 7 cm environ, tassée sur un bouchon de laine de verre, un autre bouchon étant placé à l'extrémité supérieure de la colonne. La colonne est lavée avec 1,5 ml de chloroforme avant emploi.

2) - Soit avec le florisil, la colonne étant préparée de la même façon.

L'élution des stéroïdes se fera par des solutions de concentration variable d'éthanol (silicate-célite) ou de méthanol dans le chloroforme (Florisil).

L'éluat méthanol-chloroforme est évaporé à sec sous courant d'air ou sous courant d'azote. La réaction de PORTER-SILBER se fait sur le résidu sec.

Certes, l'adsorption sur colonne retient la majeure partie

des impuretés et des chromogènes parasites présents dans les extraits, et donne des éluats très propres, mais elle présente un certain nombre d'inconvénients :

- longueur des manipulations, qui la rend difficilement applicable à la routine clinique

- difficultés d'obtenir des colonnes constantes dans leurs propriétés. Ceci vient notamment du fait que les lots de florisil sont d'inégale qualité.

Malgré une préparation longue et attentive (lavage, activation au four à mouffle), le pouvoir adsorbant du florisil peut être très variable, fonction notamment de la taille des grains, de leur degré d'hydratation, des effets de leur préparation par la chaleur (activation au four à mouffle, dessiccation à l'étuve ensuite).

Ainsi de légers changements dans ces variables sont susceptibles d'entraîner des variations considérables dans le pourcentage de récupération des stéroïdes et en outre de conférer aux témoins des valeurs élevées (KASSENAAR, II-24,25).

Le même lot de florisil peut donner d'un jour à l'autre des variations d'adsorption importantes. Ces variations sont peut-être dues à des facteurs difficilement contrôlables, tels : pression atmosphérique, température, humidité, poussières. Aussi NELSON et SAMUELS recommandent-ils d'effectuer le dosage des 17-hydroxycorticostéroïdes plasmatiques dans un laboratoire à air conditionné, à température constante.

Ainsi s'explique la variabilité des pourcentages de récupération de l'hydrocortisone ajoutée au plasma traité par la méthode de NELSON et SAMUELS, comme en fait foi le tableau suivant emprunté à ces auteurs.

17-hydroxycorticostérone ajoutée	Récupération du stéroïde ajouté %
1	95
2	85
3	95
4	92
1	112
2	116
3	92
4	91
1	82
2	132
3	83
4	103
1	55
2	107
3	91
4	98
1	80
2	105
3	102
4	115

TABLEAU N° 6 - Pourcentages de récupération de l'hydrocortisone ajoutée au plasma, traité par colonne de florisil.
(NELSON et SAMUELS)

Les limites extrêmes de ces pourcentages sont 55 et 132% avec 40% de pourcentages de récupération supérieurs à l'unité. Compte tenu du fait que la quantité d'hydrocortisone retrouvée est fonction non seulement du passage sur colonne de florisil, mais aussi des différents autres temps opératoires de la méthode (extraction-évaporation-réaction colorée), on

s'étonne que dans plus d'un tiers des cas, la quantité d'hydrocortisone mesurée soit supérieure à celle ajoutée. Il est vraisemblable qu'une récupération aussi élevée témoigne de la présence d'artéfacts ou de chromogènes parasites. Ceux-ci majorent la réaction de PORTER-SILBER (ou l'absorption d'arrière-fond, éventuellement la plus plausible, mais qui entraînera une diminution du pourcentage de récupération si l'on prend soin de comparer tube témoin et tube dosage ou de faire une correction d'ALLEN).

L'absence de lecture à 3 λ différentes ne permet pas de dire si la coloration mesurée dans ces expériences donne bien un pic d'absorption à 410 m μ spécifique de l'hydrocortisone.

Aussi est-il recommandé pour chaque dosage de "tester" la colonne elle-même en faisant passer un standard d'hydrocortisone à travers la colonne.

En se pliant à une technique rigoureuse et rigide, la colonne de florisil donne une bonne reproductibilité comme HARWOOD et MASON (II, 22) l'ont montré dans une étude critique de la méthode de NELSON et SAMUELS.

Néanmoins, beaucoup d'auteurs WEICHSELBAUM (II-69_a), SILBER-BUSCH (II-59), EIK-NES (II-16), KASSENAAR (II-24,25) ont renoncé à la chromatographie sur colonne de florisil en raison des difficultés techniques rencontrées

3) - L'adsorption sur colonne d'alumine ne semble pas jusqu'ici avoir été appliquée au dosage plasmatique des 17-hydroxycorticostéroïdes. Nous ne l'avons pas encore expérimentée.

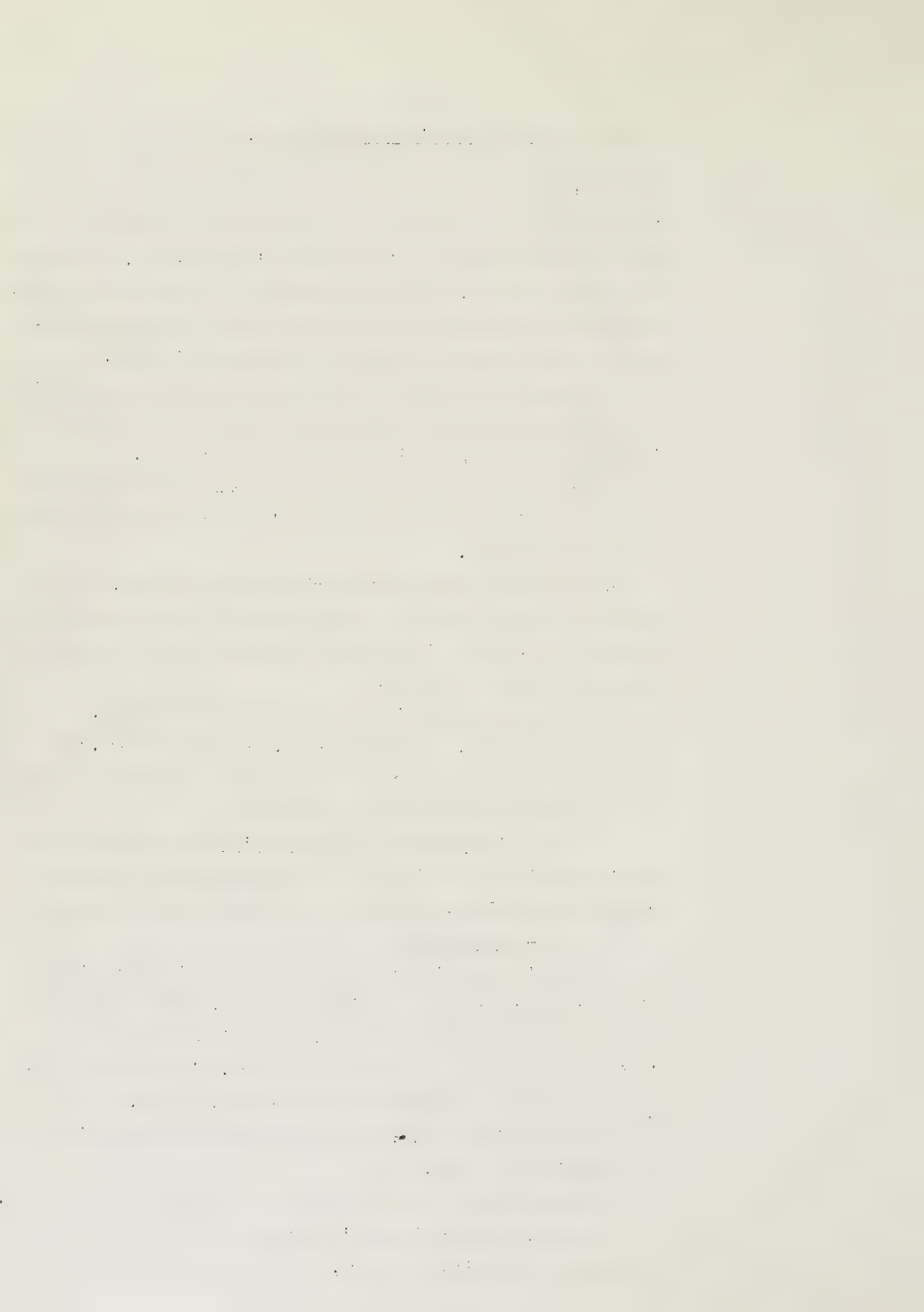
4) - Les résines

En vue d'éviter l'hydrolyse dont on peut affirmer qu'elle laisse échapper certains stéroïdes conjugués, BUSCH (II-5) a utilisé dans les dosages urinaires, les résines échangeuses d'anion (permutide) en colonne de 1 x 20 cm. L'élution des stéroïdes se fait par un mélange méthanol-NH₃OH, 9 v/lv.

La préparation de la résine par lavage au méthanol lui assure une stabilité de 2 mois.

Les reproches faits au florisil sont applicables aux résines.

Au total, les techniques d'adsorption sur colonne permettent d'obtenir des extraits très purs, mais la longueur des manipula-



tions, les variations du pouvoir adsorbant du florisil ou du silicate de silice d'un lot à l'autre, constitue un obstacle à leur emploi en routine clinique.

b) - LA CHROMATOGRAPHIE SUR PAPIER

Différents systèmes chromatographiques ont été proposés pour isoler les stéroïdes. Ces techniques sont indispensables pour identifier avec précision les stéroïdes et garantir la validité des réactions chimiques supposées les caractériser. Mais la chromatographie sur papier ne permet, en principe, qu'une estimation semi-quantitative des stéroïdes présents dans l'échantillon, par rapport à un étalon mené en parallèle.

Récomment COHN et BONDY (J. Biol. Chem. 1959 v.I, p. 31-4) ont réussi l'isolement, la caractérisation, et même le dosage différentiel des glycuronides de H_4E et H_4F , par électrophorèse (isolement des glycuronides des sulfates) et chromatographie associée (séparation des glycuronides de H_4E et H_4F dans le système suivant : méthanol - acétate d'éthyle, puis acétate de N butyl-n butanol-acétique 10% (80:20:100) pour la phase mobile.) Le dosage des glycuronides se faisant par la réaction au carbazole.

IV - LES TECHNIQUES DE PARTAGE LIQUIDE-LIQUIDE

a) PARTAGE BENZENE-EAU.

Déjà recommandée par DE COURCY et GRAY (II-12), c'est la solution proposée par LEIK-NES (II-17), fondée sur les travaux de TALBOT et ses coll.

Les corticoïdes libres sont extraits par le chloroforme. Les différentes fractions chloroformiques sont collectées, puis évaporées à sec. L'extrait sec est alors dissous dans 3 ml de benzène et 6 ml d'eau désionisée. Après agitation douce et centrifugation à 450 tours/minutes, pendant 5 minutes, la phase aqueuse est prélevée et mise de côté dans un tube à centrifuger.

L'opération est répétée 3 fois dans les mêmes conditions, les différentes phases aqueuses sont collectées, et tout le matériel qui a été utilisé pour ce temps opératoire est soigneusement rincé à l'eau distillée. L'eau de rinçage est ajoutée à l'ensemble des phases aqueuses.

La fraction aqueuse est alors extraite 3 fois par le chloroforme. Chaque extrait chloroformique est ensuite filtré sur papier.

Whatman n° 2, 2 à 3 gr. environ de sulfate de soude anhydre ayant été déposés au fond du filtre. Les extraits chloroformiques réunis sont évaporés à sec et chromatographiés ensuite sur colonne de Florisil selon la méthode de NELSON et SAMUELS.

Par différents contrôles, EIK-NES a pu démontrer que :

- Il n'existait, lors de la purification de 100 ml de plasma, aucune trace résiduelle chromatographiquement décelable de cortisone ou d'hydrocortisone dans la phase benzénique.

- La récupération de l'hydrocortisone cristallisée ajoutée à du plasma préalablement débarrassé des corticostéroïdes libres, est satisfaisante : le pourcentage de récupération s'échelonne entre 83 et 93%, comme l'indique le tableau suivant :

:	:	:	:
:	:	Quantité ajoutée	Récupération % :
:	:	:	:
:	:	:	:
:	:	:	:
:	:	1 µg	86 . 84 . 83 . :
:	:	2 µg	91 . 86 . 89 :
:	:	3 µg	90 . 92 . 89 :
:	:	200 C.p.m. au-dessus de	92 . 90 . 93 :
:	:	la radioactivité de fond :	:
:	:	:	:
:	:	:	:

TABLEAU N° 7 : % récupération de quantités connues de cortisol cristallisé ou de cortisol 4^{14}C dans la phase aqueuse d'un partage eau-benzène, effectué sur un extrait chloroformique de plasma humain.

-d'après EIK-NES -

Cette purification par partage benzène-eau est particulièrement recommandée dans la technique de SILBER et PORTER, dont les procédés de purification se révèlent parfois insuffisants, pour enlever tous les chromogènes (médicamenteux ou non) du plasma, notamment en cas d'affections hépatiques, surtout en l'absence de chromatographie sur colonne.

Le partage benzène-eau a été également effectué avec succès sur des extraits dichlorométhanoliques évaporés à sec.

La récupération de l'hydrocortisone cristallisée pour des

quantités variant de 0,1 à 1,6 μg est comprise entre 94 et 100%. De plus, le taux des 17-hydroxycorticostéroïdes plasmatiques ne varie pas de façon significative, selon que le plasma est traité par la méthode de NELSON et SAMUELS, ou de SILBER-PORTER, si le partage benzène-eau est effectué dans les deux cas, ainsi que le montre le tableau suivant, toujours emprunté à EIK-NES :

	17 OH CS ($\mu\text{g}/100 \text{ ml. de plasma}$)	
	Méthode de Net S	Méthode de S et P
Sujet normal	10,6	9,4
" "	8,9	10,1
" "	12,4	11,1
♀ 3 jours après accouchement ..	22,1	21,4
♀ 3 jours après accouchement ..	34,6	32,3
♀ 3 jours après accouchement ..	39,0	37,6
Contrôle (chienne)	2,3	1,8
6 jours après hypophysectomie	0,3	0,0

TABLEAU N° 8 : Taux comparatifs des 17-hydroxycorticostéroïdes plasmatiques déterminés par la méthode de NELSON et SAMUELS, et celle de SILBER et PORTER, avec dans les 2 cas, partage benzène-eau.

- d'après EIK-NES -

Cette purification par partage benzène-eau permet enfin d'obtenir avec l'une ou l'autre des deux méthodes un pic d'absorption à 410 m μ spécifique des 17-hydroxycorticostéroïdes, alors que ce pic ne s'observe que rarement en son absence.

Le partage benzène-eau augmente ainsi la spécificité du dosage.

b) - D'AUTRES TECHNIQUES DE PARTAGE ont été proposées :

- BONDY et ALTROCK (1-7) font à pH₁ un partage alcool-isopropylique

(à 10%)-toluène : le toluène entraînerait acides et pigments biliaires, la progestérone et d'autres lipides. Ils ajustent ensuite à pH 5 avec le sulfate de baryum qui adsorbe des lipides.

La récupération de l'hydrocortisone par la méthode complète de BONDY et ALTROCK est de l'ordre de 60 à 70%.

- KASSENAAR et coll. (II-24,25) purifient leurs extraits par un mélange de toluène-ligroïne, (50/50), puis le pentane.

- SWEAT et coll. (II-61) utilisent un partage éther de pétrole-alcool à 70% avant de chromatographier leurs extraits sur une micro-colonne d'acide silicique, par un mélange chloroforme-éthanol.

La purification par partage liquide-liquide ne semble pas majorer la perte de stéroïde au cours des multiples manipulations qu'elle exige, ainsi qu'en témoignent les chiffres publiés par KASSENAAR et coll. (II-24,25).

Avant addition de E	Après addition de 5 µg de E	% de récupération
3,5	8,3	96
1	5,5	90
1	5	80
1	6,2	104
5	9	80
2	7	100
5,8	11	104
4,8	9,4	92
4,9	10	99
1,8	6,2	88
1,7	6,4	94
0,9	4,9	80
4,4	9,1	94
1,4	6,1	94
MOYENNE	—	93

TABLEAU N° 9 : Pourcentages de récupération après addition de 5 µg de cortisone à différents plasmas.
- d'après KASSENAAR et coll. -

En dépit des difficultés à obtenir des lots de florisil identiques dans leurs propriétés, notamment dans leur pouvoir adsorbant, la chromatographie sur colonne de florisil semble constituer la méthode de purification des extraits plasmatiques la plus sûre et surtout la

plus complète.

Mais les méthodes de partage liquide-liquide purifient de façon satisfaisante les extraits avec une simplicité et une rapidité d'exécution bien supérieures.

D - DISTILLATION DES SOLVANTS

La faible quantité de corticostéroïdes libres ou conjugués contenus dans 10 ml de plasma, 0,8 µg à 1,5 µg en moyenne, encore diminuée par les différents temps d'extraction et de purification, oblige souvent à évaporer le solvant pour concentrer les stéroïdes. Une telle pratique ne peut se concevoir que si l'extrait est très pur, sinon il apparaît un important résidu après évaporation, qui rend toute lecture impossible. L'évaporation sera faite à une température n'excédant pas 50°, sous vide avec courant d'air filiforme ou mieux courant d'azote, amené par un tube capillaire.

L'influence de l'oxygène d'une part, de la chaleur de l'autre, sur les 17-hydroxycorticostéroïdes est très discutée. Si certaine, dont REDDY et coll. (II-52), NELSON et SAMUELS (II-43), admettent que ni l'un ni l'autre ne détruisent de façon appréciable les stéroïdes (aussi bien REDDY évapore le butanol dans un bain-marie à 90-95°), la plupart des auteurs préconisent une température de l'ordre de 40 à 50°.

De toute façon, KASSENAAR et coll. (II-24,25) recommandent à juste titre de filtrer le courant gazeux (air ou mieux azote) à travers de la laine de verre, afin d'éviter la contamination des extraits par des impuretés venues des tuyauteries en caoutchouc.

E - DOSAGE PHOTOMETRIQUE

I - TOUS LES STEROIDES PORTEURS DE LA CHAÎNE DIHYDROXYACETONIQUE réagissent avec la phénylhydrazine en milieu acide sulfurique concentré-éthanol, pour former une phénylhydrazone en -21, avec apparition d'une coloration jaune donnant un maximum d'absorption photométrique à 410 mμ. Telle est la réaction décrite par PORTER et SILBER (II-49).

La chaîne dihydroxyacétonique subirait un premier remaniement (MATTOX-réarrangement) avec formation d'un 20-21 cétal, la phénylhydrazine venant se fixer sur le carbone 21.

Il est probable que la conjugaison, notamment la glycuco-conjugaison, même si elle concerne le carbone 21 ou le groupement $\Delta_4-3\text{ CO}$, une fois réduit, se trouve hydrolysée par l'acide sulfurique concentré, puisque la réaction de PORTER-SILBER est encore positive avec les stéroïdes conjugués.

La forme prégnane de ces stéroïdes, tétrahydrocortisone (H_4E), tétrahydro-hydrocortisone (H_4F) réagit de façon identique, mais donne une coloration sensiblement plus faible. L'existence d'une absorption secondaire (à 320, 380 mμ) de l'hydrocortisone et de la cortisone, confirme le fait qu'une molécule de phénylhydrazine se fixerait à la chaîne latérale dihydroxyacétonique, et une autre molécule au groupe $\Delta_4-3\text{ CO}$ avec formation d'une diphénylhydrazone, SILBER-PORTER (II-58_b).

Si les fonctions alcools en 17 et 21, ou cétone en 20 sont réduites, la réaction colorée ne se produit pas.

II - SPECIFICITE

Cette réaction n'est pas tout à fait spécifique des 17-hydroxycorticostéroïdes. En effet, bien que ne possédant pas de fonction OH en 17, les formes aldehydes en C 21 de la 11-dehydrocorticostérone (composé A de Kendall) et de la corticostérone (composé B de Kendall) donnent une réaction de PORTER-SILBER positive. Ceci tiendrait au fait que la phénylhydrazine réagirait avec le groupement $\Delta_4-3\text{ CO}$ de ces stéroïdes.

Ainsi, toute une série de stéroïdes non porteurs de la chaîne dihydroxyacétonique, mais d'un groupement $\Delta_4-3\text{ CO}$, à savoir DOC, corticostérone, progestérone, testostérone et méthyltestostérone, et bien d'autres, donnent une réaction de PORTER-SILBER positive, et peuvent même réagir avec

E - DOSAGE PHOTOMETRIQUE

I - TOUS LES STEROIDES PORTEURS DE LA CHAÎNE DIHYDROXYACETONIQUE réagissent avec la phénylhydrazine en milieu acide sulfurique concentré-éthanol, pour former une phénylhydrazone en -21, avec apparition d'une coloration jaune donnant un maximum d'absorption photométrique à 410 mμ. Telle est la réaction décrite par PORTER et SILBER (II-49).

La chaîne dihydroxyacétonique subirait un premier remaniement (MATTOX-réarrangement) avec formation d'un 20-21 cétal, la phénylhydrazine venant se fixer sur le carbone 21.

Il est probable que la conjugaison, notamment la glycuco-conjugaison, même si elle concerne le carbone 21 ou le groupement $\Delta_4-3\text{ CO}$, une fois réduit, se trouve hydrolysée par l'acide sulfurique concentré, puisque la réaction de PORTER-SILBER est encore positive avec les stéroïdes conjugués.

La forme prégnane de ces stéroïdes, tétrahydrocortisone (H_4E), tétrahydro-hydrocortisone (H_4F) réagit de façon identique, mais donne une coloration sensiblement plus faible. L'existence d'une absorption secondaire (à 320, 380 mμ) de l'hydrocortisone et de la cortisone, confirme le fait qu'une molécule de phénylhydrazine se fixerait à la chaîne latérale dihydroxyacétonique, et une autre molécule au groupe $\Delta_4-3\text{ CO}$ avec formation d'une diphénylhydrazone, SILBER-PORTER (II-58_b).

Si les fonctions alcools en 17 et 21, ou cétone en 20 sont réduites, la réaction colorée ne se produit pas.

II - SPECIFICITE

Cette réaction n'est pas tout à fait spécifique des 17-hydroxycorticostéroïdes. En effet, bien que ne possédant pas de fonction OH en 17, les formes aldehydes en C 21 de la 11-dehydrocorticostérone (composé A de Kendall) et de la corticostérone (composé B de Kendall) donnent une réaction de PORTER-SILBER positive. Ceci tiendrait au fait que la phénylhydrazine réagissait avec le groupement $\Delta_4-3\text{ CO}$ de ces stéroïdes.

Ainsi, toute une série de stéroïdes non porteurs de la chaîne dihydroxyacétonique, mais d'un groupement $\Delta_4-3\text{ CO}$, à savoir DOC, corticostérone, progestérone, testostérone et méthyltestostérone, et bien d'autres, donnent une réaction de PORTER-SILBER positive, et peuvent même réagir avec

l'acide sulfurique seul, donnant alors des blancs élevés. En fait, sur le plan pratique, beaucoup d'entre eux n'interfèrent que pour des concentrations très élevées de l'ordre du milligramme. Dans tous ces cas, cette réaction se distingue de celle habituellement observée avec l'hydrocortisone ou la cortisone, par son intensité moindre d'une part, et surtout par un maximum d'absorption situé à 340 mμ d'autre part.

Bien plus, de nombreux corps (cf. tableau N° 10) notamment les iodures, le chloral, la quinine, la colchicine, la paraldehyde, sont susceptibles de donner une véritable coloration de PORTER-STURBER avec pic d'absorption à 410 mμ comme en font foi les courbes d'absorption suivantes rapportées par LEFTIN et MARKS (II-30).

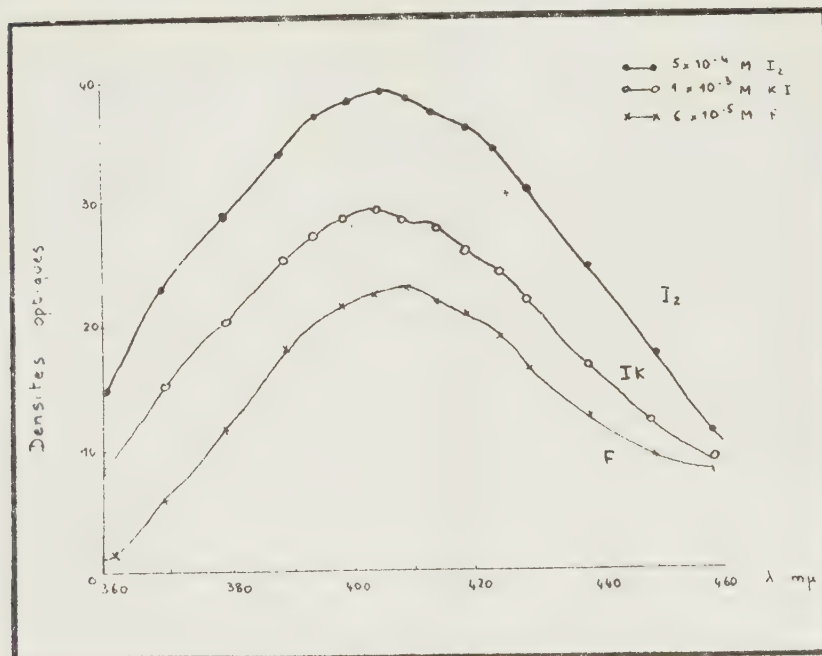


FIG N° 8 - Spectres d'absorption comparés de F, I_2 , IK, en présence d'une solution de SO_4H_2 -phénylhydrazine. Densités optiques corrigées contre un "témoin blanc" avec SO_4H_2 seul.

Composés	Quantité (mg.)	Densité Optique 410 mμ
Acide Acétyl salicylique	10	0
Acide Ascorbique	10	0,004
Bitazolidine	10	0,003
Hydrate de chloral	10	0,003
Maleate de chlore trimeton	10	0,004
Dextrose	10	0
Oestrone	0,5	0,003
Bleu d'Evans (T 1824)	10	0,002
1 - Méthadon	10	0,005
Pentobarbitate de sodium	10	0,002
Acide 1. aminobenzoïque	10	0
Pénicillinate de Sodium	10	0
Iodure de potassium	10	0,003
Chlorhydrate de pyridoxine	10	0
Riboflavine	0,1	0,002
Sulfate de streptomycine	10	0
Sulfanilamide	10	0,004
Aminopyrine	10	0,009
Diparool	10	0,213
Oestradiol	0,5	0,012
Menadione	10	0,087
Paraldéhyde	0,1	0,094
Progestérone	0,5	0,024
Chlorhydrate de quinine	10	0,173
Hydrocortisone	0,02	0,437

TABLEAU N° 10 : Densités optiques de différentes substances, dissoutes dans 10 ml d'eau, extraites par 25 ml de Chloroforme (avec lavage à la soude 2 ml 0,1 N) soumises à la réaction de PORTER-SILBER (d'après SILBER et BUSCH) -

Enfin, comme le soulignait déjà MASON en 1955 (II-38_p), l'acide sulfurique fort peu, à lui seul, réagir avec certaines substances organiques en donnant des

valeurs de "témoins blancs" supérieures à celles des dosages.

Ainsi, LAMPE, HINTZEN et HUIS IN'T VELD (II-29), ont montré que la sulfamérazine augmente considérablement la densité optique du témoin entre 400 et 510 $m\mu$, rendant impossible la lecture du dosage.

Cette réaction parasite ne serait pas due au groupement sulfamylamide

Bien souvent, la valeur du dosage est représentée par la petite différence qui sépare les valeurs élevées des "blancs" de celles des "dosages".

III - TEMPERATURE OPTIMA DE LA REACTION

Il a été démontré expérimentalement que la réaction colorée de PORTER-SILBER est maximum à 23-25° C au bout de 8 à 18 h., à l'abri de la lumière de préférence. PETERSON (II, 48)

Il est possible d'obtenir une réaction accélérée en chauffant la solution de stéroïdes en présence du réactif de PORTER-SILBER à 60° $\pm$ 1° pendant 20 mn., 30 mn., ou 60 mn., ; REDDY, NELSON, et SAMUELS (II, 43), mais alors la réaction colorée est moindre (cf figure N° 9).

Des températures supérieures ont été essayées sans succès la coloration faiblit en effet, pour des températures supérieures à 60°. La coloration est stable pendant 45 minutes environ. Elle continue à se développer encore après l'incubation : il est ainsi recommandé d'en arrêter le cours en plongeant les tubes pendant 3 minutes dans un bain d'eau glacée.

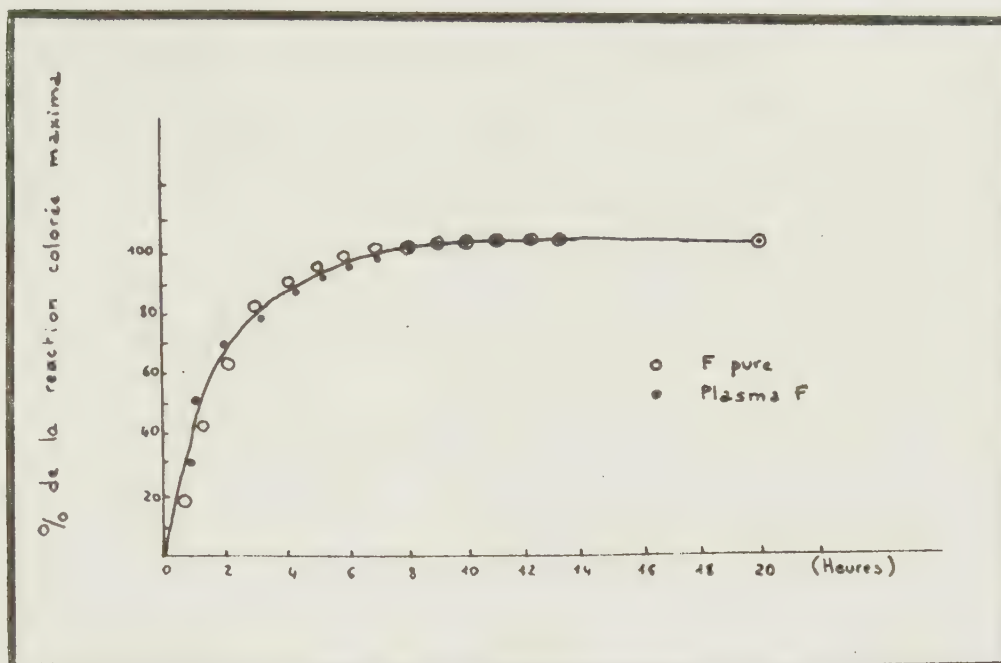


FIG N° 9 - Intensité de la réaction colorée obtenue avec la F pure et les 17-OHCS plasmatiques en milieu phénylhydrazine-acide-sulfurique-éthanol à 25°C.

- D'après PETERSON -

THE UNIVERSITY OF CHICAGO PRESS

THE UNIVERSITY OF CHICAGO PRESS

THE UNIVERSITY OF CHICAGO PRESS

THE UNIVERSITY OF CHICAGO PRESS

THE UNIVERSITY OF CHICAGO PRESS

THE UNIVERSITY OF CHICAGO PRESS

IV - CONCENTRATION OPTIMUM DES REACTIFS

a) - Pour obtenir une coloration maximum, la concentration de l'éthanol dans le réactif de PORTER-SILBER doit être de 30 à 50%, celle de l'acide sulfurique de $40\% \pm 2\%$, PETERSON.

La phénylhydrazine intervient également: la concentration maximum serait de 20 μg de phénylhydrazine pour 1 μg de hydrocortisone, une concentration supérieure n'étant d'aucun avantage, PETERSON.

L'adsorption moléculaire de la diphenylhydrazine d'hydrocortisone est de 22.500 ou de 23.500 en présence de traces de dichlorométhane, PETERSON (II-48).

b) - Cet ordre de sensibilité (0,004 p.p.m.) et l'emploi d'un petit volume (0,8, 0,5 ou 0,2 ml) de réactif de PORTER-SILBER rendent inutile en principe l'addition préalable d'hydrocortisone au plasma comme l'avaient initialement proposé SILBER et PORTER: l'addition d'hydrocortisone était alors nécessaire, étant donné que les faibles concentrations d'hydrocortisone et de ses dérivés dans le plasma ne permettaient pas d'obtenir un pic d'absorption à 410 m μ , avec un volume de réactif supérieur à 0,8 ml.

L'emploi d'une petite quantité de réactif de PORTER-SILBER est donc nécessaire à l'obtention d'une réaction colorée appréciable, tant à l'oeil nu qu'au spectrophotomètre, étant donné les concentrations aussi faibles (de l'ordre de 0,25 à 0,8 μg environ d'hydrocortisone) que celles contenues dans le tube dosage après extraction plasmatique et partage aliquote des extraits.

Aussi bien tous les auteurs adoptent-ils un petit volume de réactif de PORTER-SILBER inférieur à 1 ml en moyenne: 0,8 ml pour PORTER-SILBER et SILBER-BUSCH, 0,5 ml pour NELSON et SAMUELS et nous-mêmes, 0,2 ml pour PETERSON.

Il était permis de se demander, dans ces conditions, si le déséquilibre flagrant entre le réactif de PORTER-SILBER (0,5 ml) et le dichlorométhane (20 ml), soit un rapport de 1/40, ne pouvait entraîner une perte de stéroïdes considérable. Il est curieux, en effet, que l'on doive extraire le plasma avec 2 fois au moins son volume de solvant, et que par contre, le passage des mêmes stéroïdes du dichlorométhane dans le réactif de PORTER-SILBER puisse se faire contre un rapport de

volume inverse, de l'ordre de 1/80 comparé à celui de l'extraction plasmatique.

Et pourtant PETERSON (II-48) a montré que la récupération de 2 µg d'hydrocortisone à partir de volumes variés de dichlorométhane compris entre 1 et 40 ml, dans 0,2 ml de réactif de PORTER-SILBER, est particulièrement satisfaisante, supérieure à 95% pour un rapport dichlorométhane/réactif de PORTER-SILBER égal à 100.

Dichlorométhane Ml	Rapport Dichlo- rométhane - Réactif de PORTER*	Index d'Absorption Moléculaire	Extraction %
0		23,500	100
1	5 : 1	23,500	100
2	10 : 1	23,100	98,3
5	25 : 1	22,600	96,3
10	50 : 1	22,400	95,3
20	100 : 1	22,200	94,5
30	150 : 1	21,900	93,3
40	200 : 1	21,500	91,5
	à		

TABLEAU N° 11 : Extraction de 2 µg de F à partir de volumes variés de dichlorométhane par le réactif de PORTER
- d'après PETERSON -
(Réactif de PORTER : 0,2 ml.)

Nous avons nous-mêmes avec 0,5 ml de réactif de PORTER-SILBER et 20 ml de dichlorométhane (R = 1/40) retrouvé des pourcentages de récupération identiques.

Ainsi, malgré une disproportion "inquiétante" des volumes de réactif de PORTER-SILBER et de dichlorométhane, il n'y a pas de perte notable d'hydrocortisone lors de son passage d'une phase dans l'autre.

c) - Plusieurs "formules" de réactif de PORTER-SILBER ont été proposées, variant non seulement dans les proportions respectives de SO_4H_2 , de l'éthanol, de la phénylhydrazine, mais aussi dans leur mode de préparation :

(X) La formule initiale était la suivante: (PORTER-SILBER II-49)

- SO_4H_2 à 62% (310 ml SO_4H_2 pur/190 ml eau distillée) { 100 ml
- éthanol absolu { 50 ml
- chlorhydrate de phénylhydrazine { 65 mg

Ce réactif donne une coloration satisfaisante pour la cortisone et l'hydrocortisone, mais les valeurs obtenues avec la tétrahydrohydrocortisone (H_4F) sont plus faibles (70-85% de celles de l'hydrocortisone), à 410 μ , comme avec la ^{cort}réaction d'ALLEN.

(₅) Autre formule :

- SO_4H_2 à 62% { 85 ml
- éthanol absolu { 65 ml
- chlorhydrate de phénylhydrazine { 65 mg

Si l'hydrocortisone, la cortisone et la tétrahydrohydrocortisone donnent des résultats très voisins, la coloration est cependant dans l'ensemble inférieure de 20% à celle obtenue avec la précédente formule.

(₆) NELSON et SAMUELS proposant (II-43) :

- SO_4H_2 à 62% (10 ml)
- Phénylhydrazine (Chlorhydrate) ... (16 mg) { 3 vol.
- Méthanol 2 vol.

(₇) REDDY utilise (II-52) :

- SO_4H_2 à 62% 4 vol.
- Ethanol { 1 vol.
- Chlorhydrate de Phénylhydrazine (65 mg) }

(₈) BONGIOVANNI (I-11_a) :

- SO_4H_2 à 62% { 100 ml } 3 vol;
- Chlorhydrate de phénylhydrazine .. { 65 mg }
- Ethanol 1 vol.

(₉) PETERSON (II-48) :

- SO_4H_2 à 64% 2 vol.
- Ethanol 1 vol.
- Chlorhydrate de phénylhydrazine 50 mg (pour 50 ml du mélange précédent).

Quelle que soit la composition adoptée, tous les auteurs insistent sur la nécessité de conserver le réactif à la glacière, la durée maximum de conservation étant de 4 jours.

Beaucoup, en fait, conseillent de préparer extemporanément la solution.

Enfin, PORTER et SILBER ont remplacé le méthanol par l'éthanol, une coloration rose parasite survenant parfois lors de la réaction finale. Cette coloration rose, que nous avons également observée, n'apparaît pas avec l'éthanol. LA BROSSE (II, 28,).

F - LECTURE ET CALCULS DES RESULTATS

I - LECTURE :

a) - La majorité des auteurs utilisent le spectrophotomètre BECKMANN, modèle D.U. EN l'absence de cet appareil, il est recommandé d'utiliser, soit l'U-nicam type SP 500, soit le graphi-spectral Jouan, ou le Coleman, ou même le Jouan Junior.

b) - De toute façon, il est nécessaire d'employer, étant donné la faible quantité de réactif de PORTER_SILBER dont on dispose, des micro-cuves pour le dosage :

- 0,2 mm x 10 mm (SILBER-PORTER)
- 0,2 mm x 10 mm (NELSON et SAMUELS)
- 0,4 mm x 10 mm , ou encore
1,5 mm x 10 mm x 15 mm (PETERSON).

Ces dernières cuves, d'une contenance maximum de 0,5 ml, sont d'un emploi plus délicat en raison des phénomènes de capillarité liés à leur étroitesse : Il est difficile de vider et de nettoyer la cuve entre chaque lecture.

Il est utile, le liquide une fois versé dans la microcuve, de l'homogénéiser avec un petit agitateur de verre : on fait disparaître ainsi plus rapidement les ondes moirées qui peuvent considérablement modifier la densité optique de l'échantillon. Le nettoyage de la cuve avec, selon les cas, le réactif Blanc ou le réactif de PORTER_SILBER est également recommandé entre chaque lecture.

c) - L'emploi de microcuves nécessite souvent la mise en place d'un diaphragme spécial, destiné à calibrer le faisceau lumineux du spectrophotomètre, afin que les rayons ne viennent diffracter sur les parois latérales de la

cuve d'une part, ni traverser le ménisque supérieur du niveau du réactif d'autre part. Il n'existait pas jusqu'à cette année de diaphragme standard disponible pour les appareils Unicam.

d) - O de l'appareil. L'étalonnage de l'appareil peut être fait :

- soit contre de l'eau distillée, pour la lecture des "tubes témoins", et des "tubes dosages", les densités optiques respectives du réactif "Blanc" et du réactif de PORTER-SILBER étant déterminées séparément.

- soit contre le réactif "Blanc" pour les seuls "tubes témoins".

e) - Longueurs d'onde. La (ou les) longueur d'onde à laquelle sera lu le dosage a une importance capitale. C'est, en effet, d'elle que dépend, en grande partie, et indirectement, la spécificité de la réaction colorée. Il est indispensable de s'assurer que la coloration développée au cours de la réaction de PORTER-SILBER correspond effectivement à l'hydrocortisone ou à la cortisone, ou à leurs dérivés. L'obtention d'un pic d'absorption à 410 mμ, caractéristique de l'hydrocortisone et de la cortisone constitue un critère nécessaire et pratiquement suffisant. L'absence de pic à 410 mμ à la lecture du dosage, doit faire soupçonner l'existence d'une coloration parasite, due à des impuretés, qui rend dans ces conditions toute lecture, puis tout calcul tout à fait illusoire. Il est donc absolument indispensable d'éliminer lors de la lecture des échantillons toute coloration en rapport avec des chromogènes parasites.

Cette précaution est absolument élémentaire, sinon l'on s'expose à trouver des valeurs de dosages dans l'ensemble très supérieures à la normale et ne correspondant pas aux stéroïdes que l'on cherche à doser. Il est ainsi possible, dans des techniques aussi éprouvées que celles de NELSON et SAMUELS, de recouvrer, comme nous l'avons déjà vu, dans 40% des cas étudiés, plus de 100% de l'hydrocortisone ajoutée au plasma (préalablement débarrassé de ses stéroïdes libres). Des études similaires faites par REDDY montrent également un même excès des pourcentages de récupération.

Ainsi, faut-il, dans la mesure de la densité optique observée, analyser et tenir compte des parts respectives revenant :

- aux 17-hydroxycorticostéroïdes eux-mêmes, hydrocortisone et tétrahydro-hydrocortisone essentiellement,

- aux réactifs proprement dits: réactif "Blanc" et réactif de PORTER-SILBER,

- aux chromogènes parasites de nature stéroïdique ou non. En dehors des techniques d'identification précises tels la chromatographie sur papier, le spectre en ultraviolet et en infrarouge par exemple, il existe des "petits moyens" qui permettent de faire cette différenciation, à savoir essentiellement :

- . la purification parfaite des extraits, déjà envisagée,
- . la correction d'ALLEN,
- . la mesure comparative et simultanée du "dosage plasmatique" avec un étalon d'hydrocortisone pur, un "Blanc eau distillée", et un témoin plasmatique qui seront passés, comme le dosage plasmatique, par toutes les étapes de la méthode.

α) La correction d'ALLEN : dès 1950, ALLEN (II-1) propose une formule corrective pour éliminer les substances contaminatrices interférant dans le dosage urinaire des oestrogènes et de la D.H.A.

Dans cette formule, la densité optique corrigée de l'extrait est égale à la densité optique mesurée au pic d'absorption (ici 410 mμ) diminuée de la moyenne arithmétique des densités optiques du même extrait mesurées à 2 longueurs d'onde équidistantes de part et d'autre du pic. Par exemple, pour l'hydrocortisone :

$$D_o \text{ corrigée} = D_o \text{ 410} - \frac{(D_o \text{ 370} + D_o \text{ 450})}{2}$$

EIK-NES (II-17) propose même une lecture à 5 longueurs d'onde différentes équidistantes les unes des autres (370, 390, 410, 430, 450 mμ) afin d'éliminer tout artéfact, et pense que tout échantillon qui donne une absorption plus forte à 390 mμ qu'à 410 doit être éliminé.

O'SULLIVAN (II-45) a étudié la validité de la réaction d'ALLEN. Celle-ci n'est valable que,

- si, d'une part, les chromogènes, parasites ou impuretés, suivent la loi de BEER-LAMBERT.

- et si, d'autre part, le principal composant à doser est responsable de toute l'absorption lumineuse à la longueur d'onde choisie.

Ces conditions sont remplies s'il n'y a pas d'interactions entre

le composant et les solvants ou les autres corps en solution, et en cas de solution étalon évidemment.

Le test interne de BRAUNSBURG utilise le profil de la courbe d'absorption pour contrôler la linéarité de l'absorption d'arrière-fond. Il suffit pour cela de déterminer les différentes valeurs des densités optiques du Dosage et de l'Etalon à différentes longueurs d'onde.

En définitive, la multiplication des mesures à de nombreuses longueurs d'onde entraîne une perte de temps non négligeable, surtout pour une lecture de plusieurs dosages en série.

La formule d'ALLEN est, dans la très grande majorité des cas suffisante, puisque la densité optique des réactifs et des chromogènes parasites est en règle une ligne droite en fonction de la longueur d'onde.

3) Mesure comparative des "Témoins" et "Dosages"

KASSENAAR et coll. (II-24,25) insistent eux aussi sur la nécessité de lire le dosage à plusieurs longueurs d'onde. S'ils estiment que les modifications apportées par BAYLISS et STEINBECK (II-2_a et b), (double lecture: un témoin plasmatique avec réactif "Blanc", un dosage plasmatique avec le réactif de PORTER-SILBER), constituent un progrès important, ils proposent en cas d'échantillon plasmatique minim^o (ou en l'absence de microcuvettes notamment) deux modifications :

- lecture des extraits de 10 μ l en 10 μ l entre 370 et 460 μ l et établissement de la courbe d'absorption,

- double incubation au bain-marie à 60° des tubes :

- . la première, pendant 5 mn, des extraits auxquels a été ajouté le réactif "Blanc"; les tubes sont ensuite enlevés, refroidis, et leur contenu lu au BECKMANN, comme il a été indiqué plus haut;

- . La lecture faite, les extraits sont reversés dans les tubes, la phénylhydrazine y est alors ajoutée (0,1 ml SO_4H_2 contenant 1,75 mg de phénylhydrazine). La deuxième incubation est de 20 mn afin de permettre à la réaction colorée de se développer. La lecture est alors faite comme dans le cas précédant. Lors de cette deuxième incubation, un étalon de 5 μ g de cortisone dissout dans 0,3 ml de méthanol avec 2,6 ml de SO_4H_2 à 60% et 0,1 ml de réactif à la phénylhydrazine, est incubé parallèlement.

Ce procédé, selon ses promoteurs, permettrait, mieux que ne le fait la simple correction d'ALLEN, de préciser la courbe d'absorption des "témoins" et "dosages", par rapport à celle fournie par le composé stéroïdique pur, cortisone ou hydrocortisone, et partant, d'apprécier à sa juste valeur le degré de pureté des extraits.

De plus, la différence entre les courbes obtenues après la première (sans phénylhydrazine) et la deuxième incubation (avec phénylhydrazine) fournit celle due aux 17-hydroxycorticostéroïdes plasmatiques. Cette dernière courbe, comparée avec celle de l'étalon pur, non traité, permet alors de connaître le taux des 17-hydroxycorticostéroïdes contenus dans l'échantillon inconnu.

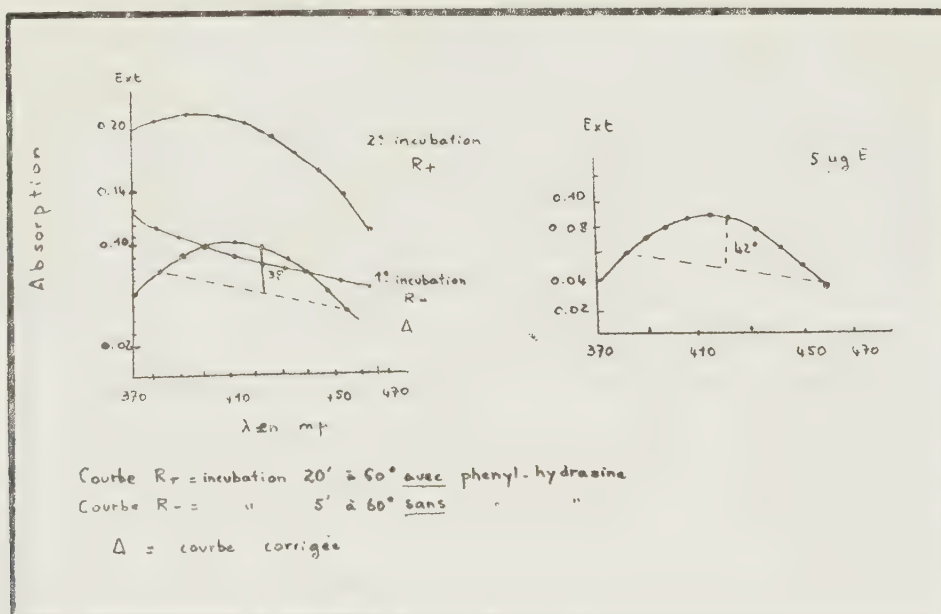


Fig N° 10 - Courbes d'absorption des témoins et dosages plasmatiques en fonction de la longueur d'onde.

Fig N° 11 - Courbe étalon donnée par 5 μg de cortisone incubée pendant 20 mn à 60° en présence de phénylhydrazine.

- d'après KASSENAR et coll. -

Une estimation aussi proche peut être obtenue en complétant la correction d'ALLEN. La correction "d'ALLEN modifiée", que nous avons adoptée, se calcule en retranchant de chaque valeur "dosage" aux trois longueurs d'onde classiques, 370, 410, 450 mμ, les valeurs correspondantes du témoin et du réactif. Ainsi, en cas d'absorption d'arrière-plan importante des témoins, la soustraction de ceux-ci des valeurs du dosage aux trois longueurs d'onde, fait apparaître le pic d'absorption caractéristique à 410 mμ, car la valeur du témoin retranchée du dosage est plus élevée à 370 mμ qu'à 410 mμ.

La correction d'ALLEN ainsi modifiée, nous semble avoir le double avantage :

- de vérifier l'existence ou non d'un pic à 410 mμ spécifique des 17-hydroxycorticostéroïdes,

- 1. - et d'éliminer en partie le rôle des chromogènes parasites si souvent rencontrés, et responsables de la coloration d'arrière-plan. Une réserve doit cependant être faite sachant, comme nous l'avons vu, que de nombreuses substances organiques peuvent donner une réaction de PORTER-SILBER authentique, avec notamment un pic d'absorption typique à 410 mμ. Il faut cependant noter à ce propos que ces substances ne donnent une absorption significative que pour des concentrations en règle beaucoup plus élevées que celles de la cortisone ou de l'hydrocortisone, et que par conséquent dans la majorité des cas, elles ne sauraient jouer un rôle important. Il sera néanmoins prudent de s'assurer notamment lors d'un dosage plasmatique chez un malade, que ce dernier n'a pas reçu de médications susceptibles d'interférer avec la réaction colorée des 17-hydroxycorticostéroïdes plasmatiques.

f)- Réactif "Blanc": solution de SO₄H₂ à 62% dans l'éthanol.
g)- Les témoins - Ils sont représentés par de l'eau distillée, ou du plasma, traités de façon identique, auxquels sont ajoutés, lors de la réaction finale, le Blanc réactif.

h)- Etalon - Toutes les lectures sont faites par comparaison avec un étalon représenté :

- soit par de l'hydrocortisone libre (et non par l'acétate) s'il s'agit de corticoïdes libres. 

- soit si possible par un glycuroconjugué d'hydrocortisone s'il

s'agit de corticoïdes conjugués (BONGIOVANNI, I, 11,).

L'étalon est dissous dans de l'eau bidistillée et traité comme le plasma.

L'hydrocortisone est choisie de préférence à la cortisone, étant donné qu'elle constitue de loin le principal 17-hydroxycortico-stéroïde circulant du plasma. L'étalon comparatif peut être mesuré lors de chaque dosage plasmatique, ou une fois pour toutes, en une courbe étalon de référence qui comportera au moins 4 points correspondant à des concentrations croissantes, (par exemple 0,5, 1, 2, et 5 µg)

II - CALCULS DES RESULTATS

La densité optique corrigée de l'échantillon plasmatique, comparée à celle d'un étalon d'hydrocortisone d'une valeur donnée traité identiquement, permet de connaître la quantité de stéroïdes contenus dans l'échantillon plasmatique. Le tableau suivant résume ce calcul en prenant par exemple :

- 10 ml de plasma à doser
- 10 ml d'eau distillée comme "témoin-eau"
- 5 µg d'hydrocortisone libre dissous dans 10 ml d'eau distillée comme étalon de référence.

Tubes "dosages"	Tubes "témoins"
Dans chaque tube :	Dans chaque tube :
0,5 ml réactif de PORTER (SO ₄ H ₂ , éthanol, phénylhydrazine)	0,5 ml réactif de BLANC (SO ₄ H ₂ , éthanol, sans phénylhydrazine)
Densités optiques	Densités optiques
Eau distillée = A	Eau distillée = a
Plasma = B	Plasma = b
Etalon = C	Etalon = c

$$\begin{aligned}
 - D & \text{ corrigée eau distillée} = A - a = E \\
 - D^o & \text{ corrigé plasma} = B - (b+E) = x \\
 - D^o & \text{ corrigé étalon F} = C - (c+E) = y
 \end{aligned}$$

$$\text{Quantité de stéroïdes/échantillon plasmatique} = \frac{X}{Y} \times 5 \mu\text{g} \quad (10 \text{ ml})$$

$$\text{Quantité de stéroïdes/100 ml de plasma} = \frac{X}{Y} \times 5 \mu\text{g} \times 10$$

NELSON et SAMUELS, pour le calcul terminal, ne comparent pas les valeurs "dosages" avec celles des "témoins". Ils utilisent simplement la densité optique fournie par une gamme-étalon d'hydrocortisone non traitée qui leur permet de connaître le facteur d'absorption. Il est facile de le déduire, connaissant l'absorption de l'échantillon plasmatique, la teneur en 17-hydroxycorticostéroïdes dudit échantillon. Il faut remarquer que dans cette technique, l'absence de mesure de témoins plasmatiques, l'absence d'étalon d'hydrocortisone traité parallèlement aux échantillons plasmatiques, font courir des risques quant à la spécificité et l'exactitude des résultats fournis.

o o
∞

CHAPITRE III

TECHNIQUE PERSONNELLE

I - PRINCIPE

La technique que nous proposons est dérivée de celle décrite par SILBER et BUSCH (II 59), pour les 17-hydroxycorticostéroïdes libres, et de celle de BONGIOVANNI et EBELREIN (I 11 a) pour les conjugués. Elle permet de doser successivement les 17-hydroxycorticostéroïdes libres et conjugués. Le principe en est le suivant :

A) - 17-hydroxycorticostéroïdes libres : On extrait les 17-hydroxycorticostéroïdes libres par le dichlorométhane. Les lipides et chromogènes parasites sont éliminés par un lavage avec une solution d'hydroxyde de soude. On utilise enfin la réaction de PORTER-SILBER à la phényl-hydrazine, réaction pratiquement spécifique des stéroïdes porteurs de la chaîne latérale dihydroxy-acétonique en C 17, dont l'hydrocortisone est le type. Ces stéroïdes donnent avec la phényl-hydrazine en milieu sulfurique concentré une coloration jaune caractéristique avec pic d'absorption maximum à 410 mμ. Un étalon de 5 μg d'hydrocortisone libre est mené en parallèle.

Chaque extrait dichlorométhanolique (correspondant au plasma et à l'étalon) est divisé en deux fractions aliquotes : l'une à laquelle on ajoute le réactif Blanc servira de témoin, l'autre à laquelle on ajoute le réactif de PORTER-SILBER à la phénylhydrazine constituera le dosage proprement dit. La lecture de la réaction colorée se fait à trois longueurs d'onde : 370, 450 et 410 mμ. Les valeurs (en densité optique) des tubes témoins à chaque longueur d'onde sont retranchées des valeurs "dosages" correspondantes. La correction d'ALLEN est alors appliquée sur les valeurs "corrigées" ainsi obtenues.

B) - 17-hydroxycorticostéroïdes conjugués : après extraction des libres on reprend la phase plasmatique restante. Après défécation des protéines avec l'éthanol absolu, un partage benzène-eau sert ici de méthode de purification.

On pratique ensuite l'hydrolyse des conjugués présents dans la phase aqueuse avec la β -glycuronidase. Les conjugués une fois libérés seront alors extraits par le dichlorométhane. La technique est ensuite la même que celle décrite pour les libres.

Avant d'aborder la description de cette technique, nous voudrions redire encore la nécessité absolue, si l'on veut mener à bien le dosage, d'opérer avec des réactifs parfaitement purs et une verrerie impeccablement propre. Ces deux impératifs catégoriques non satisfaits, pas de dosage possible.

II - MATERIEL ET SOLVANTS

A) - MATERIEL

- pipettes de précision de 10, 15 ml, et de 1 ml graduée en 1/100
- tubes à centrifuger à col rodé, munis de bouchons normalisés n° 3, contenance totale 35 ml, contenance utile : 30 à 32 ml.
L = 98 mm Diamètre intérieur = 24 mm
- Agitateur horizontal sur table
- Centrifugeuse JOUAN
- Centrifugeuse avec couronne pour 6 tubes à essai
- Tubes à essai de 125 mm de long, 19 mm de large
- Tubes à hémolyse
- Microcuvettes

Dimensions intérieures -hauteur 41 mm
-largeur 4 mm
-profondeur 10 mm

- UNICAM SP 500 muni d'un diaphragme

B) - SOLVANTS

- 1) Dichlorométhane Rhône Poulenc "Technique", purifié et distillé (selon la méthode décrite en additif p. I). Ainsi purifié, le dichlorométhane peut se conserver au moins 3 mois en glacière sans s'altérer = cf. tableau n° 12.

- 2) Ethanol absolu Rhône-Poulenc pour analyses, purifié et redistillé selon la méthode de PETERSON (II 48)
- 3) Benzène Rhône Poulenc pour analyses, purifié et redistillé (selon la méthode décrite en additif II)
- 4) Acide sulfurique concentré "pour analyses" "MERCK" ou "RIEDEL de HAEN"
- 5) Solution d'acide sulfurique à 62 %.
Ajouter peu à peu, en milieu réfrigéré, 620 ml. de SO_4H_2 concentré à 380 ml. d'eau distillée.
- 6) Solution de NaOH 0,1 N
- 7) Chlorhydrate de phénylhydrazine "MERCK", réactif D.A.B. 6.
Le produit frais doit être recristallisé 3 fois dans dans l'éthanol absolu selon la méthode de PORTER-SILBER (II 49).
Garder en dessiccateur, sur Cl_2Ca , à l'abri de la lumière. Même recristallisée, la phénylhydrazine ne doit pas être conservée plus de 10 jours environ.
- 8) β -glycuronidase I
ou β -glycuronidase d'Helix Pomatia purifiée et concentrée à partir de suc total d'Helix Pomatia, selon la méthode de Madame J. ALFSEN (additif III)
- 9) Réactif "Blanc". A 2 vol. de SO_4H_2 à 62 % (5), ajouter 1 volume d'éthanol absolu redistillé, agiter.
- 10) Réactif de PORTER-SILBER
 - . Dissoudre 16 mg de chlorhydrate de phénylhydrazine recristallisé dans 10 ml. de SO_4H_2 à 62 % (5), agiter.
 - . Ajouter ensuite à 2 volumes de cette solution 1 vol. d'éthanol absolu redistillé.
 - . Cette solution peut être gardée en glacière, à l'abri de la lumière, pendant 2 à 3 jours.Beaucoup d'auteurs en conseillent la préparation uniquement extemporanée.

Jours à compter de la date de purification	Densités optiques		
	370 mμ	410 mμ	450 mμ
0	0.019	0.011	0.009
4	0.025	0.009	0.009
6	0.007	0.003	0.004
10	0.008	0.000	0.000
13	0.000	0.000	0.000
19	0.056	0.037	0.035
23	0.015	0.007	0.007
27	0.007	0.005	0.005
39	0.022	0.012	0.013
45	0.028	0.018	0.020
54	0.032	0.020	0.019
73	0.010	0.000	0.003
95	0.025	0.011	0.008
102	0.023	0.013	0.010

TABLERAU N° 12 - Densités optiques observées à différents jours d'intervalle avec 13 ml. de Dichlorométhane "Technique" purifié (purification en date du 23.1.59) évaporés à sec et mis en présence de 0,5 ml. de réactif de Porter-Silber.

III - TECHNIQUE PROPREMENT DITE

A) - PRELEVEMENT

Le sang (10 à 30 ml.) prélevé sur héparine (une goutte est largement suffisante), est centrifugé dans la 1/2 heure qui suit le prélèvement : centrifugation à 3 500 tours pendant 10 minutes.

La phase plasmatique est recueillie.

Le plasma ainsi isolé peut être conservé en glacière environ 3 semaines avant d'être utilisé. Il est important de noter l'heure de la prise de sang, ainsi que les médications éventuelles que le malade aurait pu recevoir.

B) - DOSAGE DES 17-HYDROXYCORTICOSTEROIDES "LIBRES"

Mesurer à la pipette 10 ml. de plasma ; les verser dans un tube à centrifuger de 30 ml.

I - Extraction.

.- Extraire 2 fois par 15 ml. le Dichlorométhane redistillé : agiter chaque fois le solvant et le plasma sans brutalité pendant 2 minutes environ. Centrifuger à 4 500 - 5 000 tours pour briser l'émulsion qui se forme entre le plasma et le Dichlorométhane.

.- Recueillir à la pipette munie d'une poire, ("propipette"), la phase organique sous-jacente au plasma.

.- Réunir les 2 fractions de dichlorométhane dans un autre tube à centrifuger. On recueille environ 27 à 29 ml. de dichlorométhane.

Il est recommandé, après la deuxième extraction, de refaire une centrifugation supplémentaire qui permet de récupérer 1 à 1,5 ml. environ de dichlorométhane qui restait émulsionné avec le plasma.

II - Lavage.

.- Laver ensuite le dichlorométhane avec de la soude N/10 - 1 fois - 2 ml. Agiter à la main 30 secondes. Centrifuger une minute. Recueillir avec soin le maximum de la soude de lavage à la pipette

équipée d'une poire "propipette" et la rejeter.

.- Le dichlorométhane ainsi lavé doit être parfaitement limpide et incolore.

III - Réaction colorée -

.- Répartir le dichlorométhane en 2 fractions aliquotes de 13,5 ml.,
- l'une des fractions sert de témoin.
- l'autre de dosage.

dans des tubes à essai de 135 mm. de haut et de 20 mm. de diamètre intérieur.

.- Ajouter au tube témoin 0,5 ml. de Réactif Blanc,
au tube Dosage 0,5 ml. de Réactif de PORTER-SILBER fraîchement préparé.

.- Boucher les tubes à essai avec des bouchons en polyéthylène inattaquables et inaltérables.

.- Agiter à la main environ une minute.

.- Centrifuger à 1 500 tours, 2 minutes environ, pour assurer une rapide et complète séparation du réactif et du dichlorométhane.

La limite de séparation entre les deux phases liquides se voit parfaitement à jour frisant avec un peu d'entraînement. Le réactif de Porter se situe au fond du tube.

.- Rejeter à la pipette le dichlorométhane ; il reste toujours un petit ménisque de dichlorométhane au-dessous de la couche de réactif.

.- Recueillir enfin le réactif avec une pipette fine (pipette de 1 ml. par exemple, à extrémité effilée) raccordée :
. soit à une seringue par un tuyau de nylon.
. soit plus simplement à une micropompe en caoutchouc.

Le réactif est ainsi aisément recueilli. L'introduction inopportune de dichlorométhane dans la pipette se traduit par l'apparition de quelques "bulles" en bout de pipette, qu'il est facile de rejeter. Le réactif est parfaitement incolore et limpide. On recueille facilement 0,3 ml. de réactif, voire 0,4 ml. en opérant avec soin.

.-- Verser alors le réactif dans des tubes à hémolyse. Si par mégarde, une goutte de dichlorométhane se trouvait encore présente dans le réactif, elle s'évapore en règle durant l'incubation au bain-marie.

IV - Développement de la réaction colorée.

Laisser incuber l'ensemble des tubes :

.soit pendant 12 à 18 heures à la température du laboratoire 20°.

.soit pendant 20 minutes au bain-marie à $60^{\circ} \pm 1^{\circ}$

Il peut être utile d'obturer les tubes à hémolyse avec des bouchons en polyéthylène pour empêcher l'évaporation possible pendant l'incubation, évaporation susceptible de modifier la concentration relative des différents chromogènes dans le réactif, et par conséquent l'intensité de la réaction finale.

-Après incubation, les tubes sont plongés dans de l'eau glacée pendant quelques minutes, -afin d'arrêter le développement de la réaction colorée-, avant de procéder à la lecture au photomètre.

V - Lecture.

.-- Le réactif est versé dans des microcuves de dimensions intérieures en mm. : 41 x 4 x 10, d'une contenance totale de 1,7 ml. Nous employons un Unicam SP 500 auquel nous avons adapté un diaphragme spécial, amovible (tirette formant diaphragme coulissant dans une glissière contre une plaque servant d'armature).

Les dimensions du diaphragme : 6/10 mm. x 4 mm. ont été calculées en sorte que le faisceau lumineux à la sortie du diaphragme ne vienne pas diffracter contre les parois de la cuve. (0,3 ml. de réactif donne un niveau liquide à 6 mm. du fond de la microcuve).

De petites cales métalliques de 7 mm. de haut sont disposées sous les cuves, dans le panier porte-cuve, de façon à ce que le faisceau lumineux affleure le fond de la cuve et ne déborde pas la limite supérieure du réactif présent.

.-- Le "zéro" du spectrophotomètre est fait sur le réactif Blanc pour la lecture des tubes Témoins et sur le réactif de Porter-Silber pour celle des tubes Dosages.

(on peut également faire le zéro de l'appareil contre de l'eau distillée et tester séparément réactif Blanc et réactif de Porter-Silber dont les valeurs seront retranchées de celles, respectives, des tubes Témoins et Dosages).

Tubes Témoins et tubes Dosages sont lus à 370, 410 et 450 mμ.

VI - Etalon.

5 μg de cortisol (fonction alcool libre) en solution alcoolique (ou aqueuse, dans de l'eau distillée, ajustés alors à 10 ml. dans un tube à centrifuger,) sont évaporés dans un tube à centrifuger, dissous dans 10 ml. d'eau bi-distillée, puis traités simultanément et exactement comme les échantillons plasmatiques, d'un bout à l'autre de la méthode.

Cet étalon de cortisol sert de référence :

-d'une part pour l'appréciation de la valeur de l'extraction, de la qualité des différents réactifs utilisés et de la quantité de chromogènes apportés par ceux-ci. (Un étalon Eau bi-distillée seule nous paraît inutile, le tube 5 μg Témoin remplissant cet office).

-d'autre part, pour le calcul final de la quantité de 17-hydroxycortico-stéroïdes présents dans l'échantillon plasmatique à analyser.

VII - Calcul des résultats.

.- On retranche, pour chaque longueur d'onde considérée, les densités optiques (D.O.) des tubes Témoins de celles des tubes Dosages (D.O. brutes).

.- Sur les DO "nettes" des dosages ainsi obtenus, à 370, 410 et 450 mμ, on pratique la correction d'Allen.

Cette DO "corrigée" (A) correspond à la quantité X de stéroïdes contenue dans l'échantillon plasmatique, soit 10 ml. de plasma.

Si 5 μg d'hydrocortisone donnent une densité optique (B), mesurée dans les mêmes conditions, on peut écrire :

$$\frac{X}{5\mu} = \frac{A}{B}$$

$$\text{soit } X = \frac{A}{B} \times 5$$

et rapporté à 100 ml. de plasma, on aura : (en μ /100ml.)

$$\left\{ X (100 \text{ ml.}) = \frac{A}{B} \times 50 \right\}$$

VIII - Remarques.

Certains faits méritent d'être soulignés :

a) - Les 17-hydroxycorticostéroïdes donnent un pic d'absorption spécifique à 410 μ . L'existence de ce pic, lorsqu'elle apparaît à l'étude de la courbe des DO "brutes" en fonction de la λ , affirme la présence des 17-hydroxycorticostéroïdes ; mais il est fréquent, lorsque la concentration des 17-hydroxycorticostéroïdes, dans l'échantillon à doser, est faible, inférieure par exemple à 1 μ /10 ml., que le pic spécifique stéroïdique soit très minime, voire absent.

Mais si la valeur de la DO du Témoin est retranchée de celle du Dosage, le pic apparaît alors nettement. En effet, le témoin représente les chromogènes parasites, dont le pouvoir absorbant suit le plus souvent la loi de BEER LAMBERT ainsi la DO du Témoin croît en fonction inverse de λ , les valeurs les plus élevées s'observant aux λ les plus petites. Or, c'est précisément ce pouvoir absorbant élevé à 370 μ qui masque le pic situé à 410 μ .

b) - La faible quantité de réactif de PORTER-SILBER utilisée est nécessaire si l'on désire obtenir une réaction colorée appréciable. On peut "indirectement" accroître cette réaction colorée en utilisant des microcuvettes de 20 mm. de profondeur et non de 10 mm. Ceci est en fait impossible avec 0,5 ml. de réactif, car le niveau du réactif dans la cuve alors trop bas, se situe à cheval sur le faisceau lumineux du spectrophotomètre, ce qui rend la lecture ininterprétable.

Les microcuvettes plus petites, de 2 mm. de largeur intérieure et 0,5 ml. de contenance totale, sont peu pratiques : en effet, leur faible largeur détermine des phénomènes de capillarité qui rendent difficile leur lavage entre chaque mesure.

c) - A défaut d'un Unicam SP 500 (le modèle SP 600 se prête très mal à la mise en place d'un diaphragme), le spectrophotomètre JOUEN junior donne, pour les λ choisies (370, 410, 450 m μ) des résultats tout-à-fait comparables à ceux fournis par l'Unicam SP 500, avec une simplicité de manipulation et une rapidité d'exécution remarquables.

Cet appareil permet la lecture simultanée de 8 microcuvettes, la position du porte-cuve est stable et précise. Le diaphragme supplémentaire pour les lectures avec microcuvettes est amovible.

En principe, tout appareil précis et sensible muni d'un diaphragme approprié, peut convenir : BECKMANN, JOBIN et YVON.

d) - Les manipulations de chaque temps opératoire, doivent se faire avec des pipettes et des tubes différents pour chacun des échantillons à analyser, afin de ne pas contaminer ceux-ci.

- Le lavage de la verrerie exige un soin tout particulier : lavage à l'eau courante, puis au mélange sulfochromique, à l'eau distillée et enfin, dans le réactif correspondant au moment de l'emploi.

La très faible quantité de stéroïdes présents dans un plasma normal, 0,6 à 1,5 μ g pour 10 ml., soit 0,3 à 0,7 μ g environ dans le tube Dosage (après partage aliquote) donne une réaction colorée propre minime, donc un pic d'absorption spécifique à 410 m μ très faible. Toute introduction de substances parasites, impuretés, chromogènes, risque donc de fausser définitivement le dosage. Il n'est pas rare d'observer ainsi des tubes Témoins dont la DO à 410 m μ et à fortiori à 370 m μ , est supérieure à celle des tubes Dosages.

C) - DOSAGE DES 17 - HYDROXYCORTICOSTEROIDES "CONJUGUES"

I - Défécation.

Reprendre la phase plasmatique restante après extraction des corticostéroïdes libres. Les protéines sont déféquées et les cénapses lipido-protidiques clivées par l'éthanol à 95 % redistillé : (éthanol 2 v./1 v. plasma). L'éthanol est laissé au contact du plasma pendant une nuit à la glacière, puis agité, enfin centrifugé et recueilli.

L'opération est répétée une deuxième fois, avec 1/2 v. d'éthanol/1 vol. de plasma et séjour d'une heure seulement à la glacière avant centrifugation.

Les fractions éthanoliques sont collectées dans un tube à centrifuger, et évaporées à sec, à 40° sous courant d'air.

II - Purification.

.- Reprendre le résidu sec par 2 ml. de benzène redistillé.

.- Faire un partage Benzène-Eau, 3 fois de suite, avec 2 vol. d'Eau bi-distillée pour 1 vol. de Benzène. Le benzène se charge de pigments et de lipides. Nous utilisons 3 fois 4 ml. d'eau, pour 2ml. de benzène.

Au terme de ces 3 partages, collecter les fractions aqueuses (12 ml. environ) dans un autre tube à centrifuger.

L'extract aqueux est clair, à peine teinté de jaune le plus souvent. Il existe fréquemment une émulsion entre l'eau et le benzène. Cette émulsion peut être brisée en centrifugeant les tubes à 5 000 - 6 000 tours par minute.

L'addition de ClNa (2g. environ) facilite l'opération.

.- Un lavage supplémentaire (facultatif) au dichlorométhane, v/v, permet d'éliminer des lipides parasites, mais aussi des 17-hydroxycorticostéroïdes libres qui auraient pu échapper à l'extraction, dans la première partie de la technique.

III - L'hydrolyse enzymatique peut être faite :

.- soit avec de la β -glycuronidase C¹ (ou WARNER-CHILCOTT) (à pH 6,3 - 300 μ /ml. de substrat)

.- soit avec de la β -glycuronidase purifiée à partir de suc total "d'Hélix Pomatia", selon la technique de A. AMPSEN (V,1.), (à pH 4,5 - 300 u/ ml. de substrat).

Une réduction substantielle, de la moitié, voire des 2/3 des doses nécessaires d'enzyme, serait possible avec l'emploi d'anti-inhibiteurs de la β - glycuronidase, cystéine (4 mg./ml. de substrat) par exemple.

Les tampons utilisés sont :

- le tampon Phosphate SÖRENSEN pH 6,3 0,1 M, pour la β -gly-
curonidase " .
- le tampon Citrate ou acétate pH 4,5 0,1 M, " " "
" "Hélix Pomatia".

La durée d'incubation est de 24 heures à 37°.

IV - Extraction.

Après incubation, les 17-hydroxycortico-
stéroïdes conjugués libérés sont alors extraits comme les 17-hydroxycortico-
stéroïdes libres.

V - Etalon.

Faute de posséder un glycuconjugué
d'hydrocortisone, -en l'occurrence un glycuconjugué de tétrahydro hydrocor-
tisone- 5 μ g d'hydrocortisone traités en parallèle, serviront à la fois d'éta-
lon et de témoin pour préciser la qualité de la récupération et les pertes
inhérentes aux différentes manipulations.

VI - Le reste de la technique est identique à celle des
17-hydroxycorticostéroïdes libres.

VII - Remarques.

a) le dosage des 17-hydroxycortico-
stéroïdes conjugués, peut se faire avant toute extraction des 17-hydroxycort co-
stéroïdes libres. Après hydrolyse enzymatique, ce seront donc les 17-hydro-
corticostéroïdes totaux qui seront dosés.

Il est également possible, une fois la défécation et le partage benzène-eau effectués, d'extraire d'abord les 17-hydroxycorticostéroïdes libres, puis sur la phase restante, aqueuse, d'hydrolyser et doser enfin les 17-hydroxycorticostéroïdes conjugués.

b) Les quantités de β -glycuronidase fixées, sont celles déterminées empiriquement et adoptées par la majorité des auteurs. Il est difficile de dire en l'absence de dosages en série du même plasma, si des quantités plus importantes de β -glycuronidase (d'Hélix Pomatia) paraissent souhaitables en présence d'une concentration élevée de stéroïdes.

L'expérience des dosages urinaires prouve, en effet, que 1 000 unités de β -glycuronidase / ml. d'urine, sont amplement suffisantes pour hydrolyser les 17-hydroxycorticostéroïdes conjugués. Or 1 ml. d'urine contient approximativement 5 μ de conjugués, (en admettant qu'un litre titre 5 mg. environ). Les quantités de conjugués plasmatiques à hydrolyser sont beaucoup plus petites : en effet, même en prenant un sang très riche contenant 50 μ g / 100 ml. de corticoïdes conjugués, la quantité de stéroïdes conjugués à hydrolyser dans 1 ml. de plasma sera de 0,5 μ g environ, soit 10 fois moins que dans les urines.

Si bien que là où 1 000 u / ml. de β -glycuronidase sont suffisantes pour les urines, 100 u / ml. d'enzyme devraient théoriquement suffire même pour un plasma très riche. Les doses habituellement employées par ml. de plasma (300u.) sont donc très nettement excédentaires.

Le milieu environnant intervient peu. En effet, nous ne pratiquons pas l'hydrolyse sur le plasma brut mais après défécation et partage benzène-eau, en milieu aqueux. Dans ces conditions, il est très improbable que le milieu aqueux ait vis-à-vis de la β -glycuronidase un effet inhibiteur ou tout au moins, contrariant, plus important que le milieu urinaire lui-même.

Les mêmes remarques sont valables pour la β -glycuronidase Sigma. Cependant, cette dernière étant, semble-t-il, 3 à 5 fois plus active que la β -glycuronidase d'escargot, des doses de l'ordre de 50 u. à 100 u. / ml. de substrat devraient suffire. Une étude est envisagée pour vérifier le bien-fondé de cette hypothèse.

La cystéine, activateur indirect, de la β -glycuronidase (par inhibition de certains inhibiteurs de l'enzyme) a été essayée sur une trop petite échelle pour permettre des conclusions valables.

Il semble, toutefois, qu'elle permette une réduction sensible de l'ordre du 1/3 ou de la moitié des doses de β -glycuronidase nécessaires à l'hydrolyse. De plus, elle ne crée pas d'artefacts (cf. tableau n°13).

Nous n'avons pas l'expérience de l'acido éthylène-diamine-tétracétique, préconisé par certains auteurs.

c) La β -glycuronidase purifiée à partir du suc d'escargot ne nous a pas donné non plus, de chromogènes parasites même à des concentrations élevées, de l'ordre de 1 000 u./ml. de substrat, comme le montre le tableau suivant (n° 13) :

		LONGUEURS D'ONDE			ALLEN	β -Glycuronidase u. / ml.
		370 m μ	410 m μ	450 m μ		
Tubes		Densités optiques				
TEMOINS	A	0.006	0	0	0	0
	B	0	0	0	0	100
Réactif	C	0	0	0	0	300
"Blanc"	D	0.002	0.001	0	0	500
sans	E	0.015	0.007	0.007	0	1000
Phényl-	F	0	0	0	0	0 + cystéine
hydrazine	G	0.003	0	0	0	(4mg./ml.)
	H	0.003	0	0	0	100 + " " "
						300 + " " "
DOSAGES	A	0.012	0.004	0.002	0	0
Réactif	B	0.032	0.023	0.018	0	100
de	C	0.017	0.008	0.007	0	300
PORTER	D	0.012	0.006	0.005	0	500
SILBER	E	0.004	0.002	0.002	0	1000
à la	F	0.032	0.020	0.018	0	0 + cystéine
Phényl-	G	0.030	0.018	0.015	0	(4mg./ml.)
hydrazine	H	0.007	0.002	0	0	100 + " " "
						300 + " " "

TABLEAU N° 13 - DENSITES OPTIQUES d'échantillons d'eau bi-distillée (5ml.) additionnée de quantités croissantes (de 100 à 1000 unités par ml.) de β -glycuronidase d'escargot purifiée, traitée par la méthode complète.

d) La longévité de la β -glycuronidase Σ ne semble pas avoir été très étudiée. En ce qui concerne la β -glycuronidase d'escargot purifiée, elle n'excède pas, en principe, un mois et demi même après conservation à la glacière. Il est bon en présence d'un échantillon déjà ancien, de faire mesurer à nouveau son pouvoir glycuronidasique.

Il semble que la conservation de cette β -glycuronidase soit meilleure en chambre froide à -20° , qu'en glacière. Si cette solution est adoptée, il est recommandé de diviser le lot de β -glycuronidase en plusieurs petites fractions suffisantes pour les besoins d'un jour, car le "réchauffement" altère le pouvoir biologique de l'enzyme.

Si cette β -glycuronidase est d'un prix de revient modique, par rapport à la β -glycuronidase Σ , par contre, sa purification est longue et fastidieuse. De plus, son activité est environ de trois à cinq fois inférieure à celle de la β -glycuronidase Σ , inconvénient minime puisque des fortes doses de glycuronidase d'escargot par ml. de substrat ne donnent pas d'artefacts.

Nous nous proposons de simplifier cette technique en ne gardant que les premiers temps de la purification et de vérifier si la glycuronidase plus grossièrement purifiée ne donne pas d'artefacts et possède une activité onzymatique suffisante.

IV - VALEUR ANALYTIQUE DE LA METHODE

Nous comparerons successivement les différentes caractéristiques de la présente technique par rapport à celle des méthodes comprenant ou non l'adsorption sur colonne (pour la purification des extraits) et utilisant la réaction de PORTER-SILBER.

A) - 17-hydroxycorticostéroïdes libres.

1) EXTRACTION

Nous avons finalement adopté deux extractions successives avec chaque fois un volume et demi de dichlorométhane pour un volume de plasma. Au total, le plasma est donc extrait par trois fois son volume de

solvant organique (30 ml. pour 10 ml. de plasma).

Nous gardons les mêmes quantités de dichlorométhane même lorsque l'échantillon plasmatique est plus petit (5 à 8 ml. par exemple) afin de ne pas avoir à modifier le partage aliquote de dichlorométhane avant l'établissement de la réaction colorée. Dans ces conditions le volume de solvant organique peut atteindre 4 à 6 fois celui du plasma, ce qui donne une marge de sécurité suffisante.

NELSON et SAMUELS (II 43) ont proposé trois extractions successives du plasma par un volume et demi chaque fois de solvant organique. Des essais multiples faits par HARWOOD et MASON (II 22) avec une, deux, trois ou quatre extractions identiques ont montré que trois extractions donnent l'extraction et la sécurité optimum.

Deux extractions peuvent suffire en fait, puisque ces mêmes auteurs ont montré que la première extraction enlève 90 % de l'hydrocortisone présente dans le plasma, et la deuxième les 10 % restants. Pour HARWOOD et MASON, la troisième extraction n'est pas indispensable, mais constitue une sécurité supplémentaire. En tout cas, une quatrième extraction n'est d'aucun bénéfice.

Nous avons adopté deux extractions car quelle que soit la complexité du "milieu" plasmatique, et la force des liaisons stéroïdes-protéines, nous pensons que le volume de dichlorométhane est (compte tenu de l'affinité de ce solvant pour l'hydrocortisone libre) largement suffisant, pour ne pas dire excédentaire pour extraire une aussi faible quantité d'hydrocortisone présente dans l'échantillon (de 0,6 à 1,5 µg environ).

Même lorsque le taux de l'hydrocortisone est augmenté (30 à 40 µg par 100 ml.) deux extractions suffisent. Ce n'est que pour des taux très élevés, de l'ordre de 80 à 150 µg / 100 ml. qu'une troisième extraction est à conseiller, afin de ne pas laisser échapper de l'hydrocortisone.

2) - RECUPERATION

Des essais de récupération ont été pratiqués, soit sur du plasma intact, soit surtout sur du plasma préalablement débarrassé des 17-hydroxycorticostéroïdes libres. Dans les deux cas, des quantités croissantes d'hydrocortisone libre, un, deux, trois, et cinq µg ont été ajoutées.

Les pourcentages de récupération sont exprimés dans le tableau N° 14.

En dehors de deux résultats aberrants (109 %) sur un ensemble de 18 essais, la moyenne de récupération s'établit à 90 % avec des écarts maximum de 65 à 109 %.

Quantité d'Hydrocortisone libre ajoutée (μg)	Quantité d'Hydrocortisone trouvée	% de Récupération
1	0,9	91
2	2	102
3	2,7	91
5	4,4	89
1	0,8	82
2	2,1	109
3	2,6	89
5	4,4	88
1	0,9	90
2	2,1	109
2	1,5	77
2	1,3	65
3	2,6	87
5	4,9	99
1	0,8	82
2	1,8	92
3	2,7	92
5	4,3	87
Moyenne	-	90 %

TABLEAU N° 14 - % de Récupération de l'hydrocortisone ajoutée à différents plasmas (préalablement débarassés des 17 OH-CS libres) obtenus avec notre méthode. Un étalon 5 μg de F libre donnant 101/1000 de densité optique (valeur moyenne calculée sur 53 dosages) a été pris pour référence.

Ces pourcentages de récupération sont tout à fait comparables à ceux publiés par NELSON et SAMUELS (II,43) qui sont compris entre 55 et 132 % avec une moyenne de 96,5 % (cf. tableau N° 6, page 52)

HARWOOD et MASON (II,22) étudiant les différentes étapes de la technique de NELSON et SAMUELS et, notamment, l'influence de l'absorption sur colonnes de florisol sur la récupération de l'hydrocortisone trouvent entre 87 et 90 % de récupération pour des taux d'hydrocortisone inférieure à 6 µg / 10 ml. A des taux supérieurs, le pourcentage de récupération diminue légèrement.

Avec les méthodes n'utilisant^{pas} l'adsorption sur colonnes, les résultats sont identiques. KASSENAR et Coll. (II, 24-25) donnent 93 % en moyenne avec des limites de 80 à 104 % ; REDDY et Coll. (II,52) 102 % en moyenne, avec 94 à 120 % comme limite. PETERSON et Coll. (II, 48) 95,5 % ; WEICHSELBAUM et MARGRAF (II, 69 a) 86 % en moyenne.

Ainsi, toutes les méthodes proposées, la présente comprise, donnent sensiblement le même pourcentage de récupération et des limites voisines. Dans un nombre non négligeable de cas (40 % pour NELSON et SAMUELS) le pourcentage de récupération excède 100 %. Ce fait peut paraître surprenant. Des pourcentages aussi élevés témoignent vraisemblablement de la présence de chromogènes parasites qui majorent la réaction de PORTER-SILBER (ou l'absorption d'arrière-fond, éventualité également possible, mais qui entraînerait une diminution du pourcentage de récupération si l'on prend soin de comparer tube-témoin et tube-dosage). Il faut tenir compte aussi du fait que ces pourcentages sont calculés par rapport à un étalon d'hydrocortisone libre traité, comme les échantillons plasmatiques, par la même technique. Or, les valeurs de cet étalon oscillent autour d'une valeur moyenne. De ce fait, les résultats du dosage des échantillons plasmatiques, exprimés en pourcentage de récupération, subissent également des fluctuations.

NELSON et SAMUELS, HARWOOD et MASON signalent également de telles variations. Elles sont peut-être dues à des facteurs difficilement contrôlables, comme pression atmosphérique, température, degré hydrométrique, poussières. La plupart des auteurs ayant utilisé le florisol conseillent d'ailleurs de travailler dans des laboratoires à air conditionné pour limiter au maximum ces facteurs. Il est de toute façon souhaitable, et même nécessaire, pour chaque dosage plasmatique, de mener en parallèle un étalon d'hydrocortisone libre.

III - REPRODUCTIBILITE

Le même plasma a été analysé à plusieurs reprises et à des jours différents afin de préciser d'une part, la reproductibilité de la méthode et, d'autre part, la durée de conservation du plasma en glacière. Le tableau N° 15 montre que le plasma se conserve au moins 20 jours sans altération, et qu'il existe une bonne concordance entre la moyenne journalière et celles mesurées le même jour. Dans les deux cas, il s'agissait d'un sang très riche en 17-hydroxycorticostéroïdes libres (valeur 4 fois supérieure environ à la normale) prélevé chez deux malades en crise d'oedème sub-aigu pulmonaire.

NOMS	Heure : Prélèvement :	Jours après le prélèvement						MOYENNES	
		3	4	6	8	10	20		
TOL...	7				49,5				
			50,0		50,9		52,4	50,7	
DEL...	20	51,0		49,0	58,0	52,4			
		52,0		51,0	51,0	53,9		52,2	1,73
DEL...	12	12,0			14				
		13,5			14			13,4	
		14,0			14				
		14,0			12				

TABEAU N° 15 - Etude de la reproductibilité montrant les valeurs des 17-OH-CS libres trouvés à différents jours d'intervalle dans le même plasma, chez 3 malades.
(Sangs prélevés au cours de deux crises d'oedème sub-aigu pulmonaire, et chez un sujet normal.).

La reproductibilité de la méthode de NELSON et SAMUELS est identique à la nôtre (cf. tableau N° 16). Les valeurs aberrantes du groupe IV ne sont pas expliquées par les promoteurs de la méthode.

ECHANTILLONS	1		2		3		4		5	
	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
trouvés	5,9	6,2	5,7	5,1	5,4	5,8	14,3	13,7	5,3	6,1

TABLERAU N° 16 - Taux de F observés dans des échantillons du même sang traité en double par la méthode entière (NELSON et SAMUELS).

HARWOOD et MASON sont parvenus aux mêmes résultats et trouvent une bonne concordance entre les moyennes journalières et celles mesurées dans la même journée.

Cependant, les difficultés rencontrées par de nombreux auteurs, notamment dans l'obtention d'échantillons de florasil constants dans leurs propriétés adsorbantes, ainsi que dans l'élimination des chromogènes parasites, les ont incités à modifier, voire à supprimer ce mode de purification.

IV) - PRECISION

D'après le Tableau n° 18, on voit qu'il est possible avec la présente méthode d'estimer une concentration d'hydrocortisone de 0,1 µg par ml avec une précision de $\pm 0,05$ µg dans 95 % des cas. (dl = 21)

SILBER et PORTER (II, 58 a) obtiennent une précision de $\pm 0,6$ µg au taux de 1,3 µg par ml.

Mais ces chiffres n'expriment en fait que la sensibilité de la méthode par rapport à un lot de population. Si l'on veut définir la précision réelle, intrinsèque de la technique, il faut l'évaluer par rapport à un étalon d'hydrocortisone libre en milieu aqueux ou plasmatique, (de préférence sur un plasma préalablement débarrassé des 17-hydroxycorticostéroïdes libres).

Un étalon de 5 µg d'hydrocortisone dans 10 ml d'eau bi-distillée, traité par notre technique nous a donné une densité

optique moyenne de 0,101 (100,9 / 1000) $\pm$ 0.006 (I², dl = 53). La déviation standard est de 0,3 μ g au taux de 5 μ g pour 10 ml. Si l'on prend deux "écarts-types" (95 % des cas), la précision de la méthode au taux de 5 μ g est alors de 0,6 μ g. Ces résultats sont tout à fait identiques à ceux publiés par HARWOOD et MASON (Tableau n° 17) qui trouvent une déviation standard de 0,3 μ g au taux de 4 μ g.

Conc. Cortisone μ g	Facteur absorption Moyenne $\pm$ D.S.	*	D.S. μ g
1	0.032 $\pm$ 0.008	:	0.23
2	0.062 $\pm$ 0.008	:	0.23
4	0.136 $\pm$ 0.010	:	0.30
6	0.200 $\pm$ 0.008	:	0.23
8	0.262 $\pm$ 0.015	:	0.45

* Probabilité : 0.05, d.l. : 19, t = 2.073

TABLÉAU N° 17 - PRÉCISION DE LA MÉTHODE COLORIMÉTRIQUE ET DE LA CHROMATOGRAPHIE -

(d'après HARWOOD et MASON)

Ainsi, qu'il y ait ou non adsorption sur colonne de florisil, la précision de la méthode est tout à fait comparable.

V - IDENTIFICATION CHROMATOGRAPHIQUE DES STÉROÏDES MESURES PAR LA PRÉSENTE MÉTHODE -

Nous avons chromatographié sur papier certains plasmas, afin de voir si les chromogènes mesurés dans notre méthode étaient effectivement l'hydrocortisone et la cortisone.

a) - L'extrait dichlorométhanolique d'une fraction aliquote d'un plasma riche en 17-hydroxycorticostéroïdes libres (plasma TOU... cf. tableau

N°15) a été évaporé et chromatographié sur papier. Le système chromatographique était le Système BUSCH C.

Le chromatogramme a révélé :

- en B.T. deux taches migrant respectivement comme celles de l'hydrocortisone et de la cortisone pures mises en parallèle. Par comparaison avec une gamme de référence, les taches dûes à l'échantillon plasmatique correspondaient respectivement à environ 3 µg d'hydrocortisone et 1 µg de cortisone.
- En U.V. (à 240 mµ) il y avait également 2 taches correspondant à celles de l'hydrocortisone et de la cortisone, et équivalent, par rapport à l'étalon, à 3-4 µg d'hydrocortisone et 1-1,5 µg de cortisone.

Le dosage chimique global des corticoïdes libres par la méthode chimique donnait en moyenne 50,7 µg / 100 ml pour 4 dosages du même plasma, soit 5 µg pour l'échantillon analysé (10 ml).

La somme des chromogènes révélés par le B.T. et l'U.V. correspond approximativement à 4-5 µg d'hydrocortisone et de cortisone présents dans l'échantillon étudié.

On voit ainsi l'excellente concordance entre les chiffres trouvés par les deux méthodes, de même que l'authenticité des stéroïdes mesurés par la présente technique.

b) - Un autre plasma, celui de M. DES... prélevé en pleine crise d'oc-
cède aigu pulmonaire, titrait 64 µg/100 ml en moyenne (trois dosages du même
plasma) soit 6,4 µg / 10 ml.

La chromatographie d'un échantillon aliquote, a donné les résultats
suivants :

B.T. :	hydrocortisone	2,5 à 3 µg
	cortisone	2,5 µg
U.V. :	hydrocortisone	3 µg
	cortisone	3,5 µg

La somme des stéroïdes ~~identifiés~~ identifiés sur le chromatogramme correspond
bien à celle mesurée par la réaction de PORTER-SILBER. Une remarque s'impose
ici : le taux de la cortisone aussi bien en B.T. qu'en U.V. est égal ou supé-

-rieur à celui de l'hydrocortisone, ce qui est en contradiction avec la normale. En effet, il est maintenant bien établi que dans le sang périphérique, l'hydrocortisone est, de loin, le principal stéroïde présent, la cortisone et l'hormone S, n'existant qu'à l'état de traces. Deux explications peuvent être données de ce résultat paradoxal :

- modification qualitative de la sécrétion surrénale au cours du stress, avec "sortie" anormalement importante de la cortisone,

- artefact dû à la technique. L'évaporation sous courant d'air et à 50° de l'extrait dichlorométhanolique avant la chromatographie a peut-être oxydé partiellement l'hydrocortisone en cortisone.

c) - Un troisième plasma, prélevé à la fin d'une perfusion intraveineuse (25 mg/ 8 h) d'A.C.T.H., analysé dans les mêmes conditions, a montré :

- en chromatographie 3 µg environ d'hydrocortisone et 1 à 1,5 µg de cortisone,
- par la méthode chimique 4 µg de 17-hydroxycorticostéroïdes libres.

Les taches des différents chromatogrammes n'ont été ni découpées, ni éluées pour une identification plus précise des stéroïdes présents et un éventuel dosage par la réaction de PORTER-SILBER.

Dans l'ensemble la chromatographie sur papier a montré :

- que l'hydrocortisone et la cortisone étaient effectivement extraites du plasma par la présente technique, et que la quantité de stéroïdes mesurée par les deux méthodes, (compte tenu du fait que la chromatographie ne fournit qu'une estimation semi-quantitative) était tout à fait concordante.

L'authenticité des stéroïdes extraits par le dichlorométhane et mesurés par la réaction de PORTER-SILBER a été bien établie.

L'absence de chromogènes parasites PORTER SILBER positif ou négatifs est également prouvée, ce qui n'est pas sans intérêt, étant donnée la simplification des moyens de purification utilisés dans notre méthode.

d) Nous n'avons pas chromatographié de plasmas normaux, étant donné la faible quantité de cortisone et d'hydrocortisone présentes dans un échantillon de 10 ml.

La chromatographie de sang riche offrait plus de garanties et de précisions.

Nous nous proposons enfin de chromatographier les extraits dichlorométaboliques après hydrolyse des conjugués.

VI - CONCLUSIONS

a) - Si l'on compare la présente méthode avec la technique de NELSON et SAMUELS notamment, laquelle est considérée par beaucoup d'auteurs comme la technique la plus éprouvée et la plus sûre, on constate que l'extraction, la récupération, la reproductibilité, la précision, sont tout à fait comparables.

L'adsorption sur colonnes de florisil, une des caractéristiques essentielles de la technique de NELSON et SAMUELS ne paraît donc pas lui conférer une garantie et une sécurité "significatives". MULLER, CRABBE et SANZ (II, 41) sont parvenus aux mêmes conclusions en dosant différents plasmas par la méthode de NELSON et SAMUELS et celle de PORTER-SILBER. Mais ils n'ont établi leur comparaison que sur le seul résultat final du dosage, sans étudier chacune des étapes de l'une et l'autre méthode : sur 53 dosages effectués sur des sujets normaux après effort physique ou agression aigue, ou au cours de maladies endocriniennes, telles Addison, Cushing, Klinefelter, ou encore après A.C.T.H. intra-veineuse ou surcharge orale en hydrocortisone, ils ont pu constater qu'il existait une bonne corrélation entre les deux méthodes, à condition d'employer la correction d'ALLEN, car l'on observe souvent des courbes d'absorption atypiques en présence de réactif de PORTER-SILBER (pic d'absorption déplacé ou absent), différentes de celle de l'étalon.

b) - Les avantages de la présente méthode comparée à ceux de la technique de NELSON et SAMUELS sont les suivants :

- gain de temps appréciable.
- perte ^{de} moindre en 17-hydroxycorticostéroïdes
- facilité plus grande à obtenir des réactifs constants (moins de variations observées)

d'un lot à l'autre de réactif que d'un lot à l'autre de florisil). On ne saurait trop réaffirmer les variations importantes constatées dans les propriétés adsorbantes d'un échantillon à l'autre de florisil si soignée et minutieuse qu'en soit la préparation. Ce sont ces variations, difficilement prévisibles, et contrôlables, qui ont incité beaucoup d'auteurs à abandonner ce produit.

-résultats sensiblement voisins.

c) - Par rapport à certaines autres techniques qui n'utilisent pas l'adsorption sur colonne, celle-ci présente les avantages suivants :

-simplification, donc rapidité plus grande (pas de lavage préalable par un solvant non polaire du type hexane ou tétrachlorure de carbone, deux extractions au lieu de trois).

-partage aliquote du dichlorométhane en deux fractions permettant la mesure comparative du témoin et dosage plasmatique.

-utilisation d'une petite quantité de réactif de PORTER, 0.5 ml suffisamment petite pour conférer une précision suffisante, assez importante toutefois pour permettre des manipulations faciles.

-emploi de dichlorométhane "technique", (Rhône-Poulenc), d'un prix de revient modéré correctement purifié, avec une stabilité satisfaisante (deux mois au moins) par une technique à la fois simple et rapide. (cf. tableau n° 12).

-reproductibilité, récupération, précision voisines.

VAN DER VELS (II, 65) vient de proposer une microméthode permettant le dosage des 17-hydroxycorticostéroïdes libres dans 4 ml seulement de sang total, ou 2,4 ml de plasma. Le dosage sur de si minimes quantités de plasma est rendu possible par une réduction des réactifs, et surtout un matériel approprié, notamment l'emploi d'un dispositif plongeant dans la microcuve.

La quantité de dichlorométhane, après partage aliquote, est de 0,8 ml seulement, celle de réactif Blanc et du réactif de PORTER de 0,1 ml. Une telle méthode est évidemment très pratique ^{en} cas de dosages répétés chez l'homme, pour éviter des prises de sang trop importantes, et en cas d'étude sur l'animal le rat par exemple.

Mais comparés à notre technique, ces avantages sont plus apparents que réels. En effet :

- cette technique n'est plus assez sensible pour des valeurs de 17-hydroxycorticostéroïdes inférieures à la normale. Comme son promoteur l'a justement souligné, elle ne peut être employée que pour des sangs normaux ou "riches".

L'emploi d'un adaptateur pour la micro-cuve, paraît délicat, nécessitant entre chaque lecture photométrique un lavage minutieux, source de perte de temps.

- une aussi petite quantité de réactif de PORTER-SILBER, (0,1 ml) ne peut être mise à incuber au bain-marie à $60^{\circ} \pm 1$, sans risque d'évaporation de l'éthanol. Le même risque est à craindre, même si on laisse les tubes à la température du laboratoire pendant une nuit, à moins de les obturer soigneusement. (l'évaporation du dichlorométhane a d'ailleurs été envisagée par VAN DER VIES lui-même).

- Enfin avec notre méthode, comme nous l'avons vu, il est possible de doser sans difficulté notable, des échantillons de plasma de 5 ml environ.

De plus, VAN DER VIES n'indique ni la reproductibilité exacte, ni la précision de sa méthode, ni même les taux moyens de 17-hydroxycorticostéroïdes libres chez des sujets normaux. Par contre, l'utilisation comme étalon, de plasma préalablement débarrassé des corticoïdes libres et auquel on a ajouté une quantité connue d'hydrocortisone libre, en place d'hydrocortisone dans de l'eau distillée, est intéressante. Mais l'auteur ne donne pas d'argument chiffré en faveur de ce choix. L'utilisation du même plasma que celui à analyser pour le seul étalon oblige de plus à doubler la prise de sang initiale : l'avantage d'un tel procédé ne paraît pas dans ces conditions évident.

B - 17-HYDROXYCORTICOSTEROIDES CONJUGUES -

Etant donné le nombre encore trop limité de nos dosages de conjugués, nous ne pouvons déterminer valablement les différents critères exigibles de la technique. L'absence de glycuco-conjugué de synthèse disponible constitue de plus, une gêne non négligeable à l'établissement des "caractéristiques" de la méthode.

V - RESULTATS -

A - VALEURS NORMALES (avant ACTH)

I) - 17-hydroxycorticostéroïdes libres : chez les sujets normaux, le taux des corticostéroïdes libres est, en moyenne, de $10,2 \pm 5,4 \mu\text{g}$ ($2 \text{ } \bar{\sigma}$) / 100 ml. Il existe une différence significative, entre les taux observés avant 9 heures ($12,1 \pm 3,6 \mu\text{g}$) et après 10 heures ($8,6 \pm 2,8 \mu\text{g}$) avec respectivement pour limites extrêmes 9 - 19 μg et 6 - 11 μg . Le calcul statistique donne pour $d1 = 20$, $t = 2.33$, et $0,002 < p < 0,005$. Les résultats sont consignés dans le tableau n° 18.

L'importance des variations individuelles, déjà soulignée par de nombreux auteurs, jointe aux variations du cycle nycthémeral rend difficile l'établissement de la frontière entre la zone normale et pathologique. Il faut en principe exiger des chiffres éloignés des limites extrêmes considérées comme normales pour une méthode donnée, pour affirmer la diminution ou l'augmentation du taux des 17-hydroxycorticostéroïdes.

Compte tenu de l'heure du prélèvement et sauf indication clinique contraire, des chiffres compris entre 5 et 18 μg environ, peuvent, avec la présente méthode, être considérés comme normaux. (pour un sang prélevé dans le courant de la matinée).

Ces chiffres sont tout à fait comparables à ceux fournis par d'autres techniques comme en fait foi le tableau récapitulatif n° 19.

II) - 17-hydroxycorticostéroïdes conjugués : le nombre de dosages effectués, est encore trop faible pour faire état de calculs statistiques. 13 dosages effectués chez des sujets normaux, ont donné 8,4 μg / 100 ml. en moyenne, avec des extrêmes allant de 5 à 12 μg / 100 ml.

Dans l'ensemble, le ^{le} taux des conjugués est de 30 % inférieur à celui des libres.

NOMS	SEXE	17-OH-CS μg / 100 ml - 8/9 h.	17-OH-CS μg / 100 ml 10/11 h
LENG..	F		6
MON..	M	12	(8,5 9
HAR..	M	10	
OUT..	F	10	
PRA..	M	9,3	
FRUC.	M		(8 9,5
CHA..	M		(10,7 9,6
MAILL.	F	10	
TOR..	F		8
DEL..	F		8
COQ..	M		(8,5 10,8
LEB..	F	11,5	
HOLD.	F	(14 18,7	
LAM..	F	13	
WER..	F	13	
MEI..	F		7
MOYENNES		12,1	8,6
		1,8	1,4
MOYENNE des 2 SERIES		: 10,2	2,7

TABLEAU N° 18 : Valeurs normales des 17-hydroxycorticostéroïdes
libres chez des sujets normaux, hommes et femmes.
 Prélèvements effectués vers 8 h. et 9 h. ou entre
 10 h. et 11 h.

AUTEURS	17-OH-CS Plasmatiques Libres		17-OH-CS conjugués (μg / 100 ml)
	Limites (μg / 100 ml.)	Moyennes (μg / 100 ml.)	
A. - Méthodes utilisant la réaction de PORTER-SILBER			
Baylies et Steinbeck (II- 2)	3-16	9.5 ± 3.3 (a)	
Bliss et al. (I, 5)	2-34	12 ± 6	
Bondy et Altrock (I, 7)	-	7.8 ± 3.3	
Bongiovanni et EBERLEIN (I,9-10)	2-10	8 ± 1	
Ceresa et Cravetto (II,7)		12.7 ± 0.7	9.5 ± 0.9
Ely et al. (II, 18)	0-26.8	10 ± 1.67 (b)	
Engel et coll.(I, 33)		16 ± 3.8	
Kassenaar et al. (II,24)	-	6.3 ± 1.2	
Klein et al. (II, 26)	0-27	13 ± 1.21 (c)	8.5 ± 1.2
Nelson et Samuels (II, 43)	4-10 (sang total)	13 ± 6 15 ± 6	
Peterson, Karrer, Guerra (II, 48)	6-25	15 ± 4.5	
Silber et Porter(II,58)	6-25	13.3 ± 6.2	
Tamm, Bockmann, Voigt (II, 63-64)	-	8.3	
Wallace, Christy, Jailer (IV, 81)	4-32	16 ± 6.9	
Weichselbaum et coll. (II, 69 a)	8-16	9.5 ± 1.5	16.8 ± 1.6
Présent travail	6-20	12 ± 3.6 (d)	8.4 (5-12)
B. - Méthodes n'utilisant pas la réaction de PORTER-SILBER -			
Bondy, Upton,(I, 6) (fluorescence)	4-17.7	10.2 ± 3.6	
Morris et Williams (II,40) (polarographie)	6.5-10.5	-	
Sweat et coll.(I, 77) (fluorescence)	7.8-12.8	11	

TABLEAU N° 19 - Valeurs normales des 17-OH-CS libres et conjugués
on fonction des techniques utilisées.

NOMS	SEXE	HEURE Prélevé [†]	17 OH-CS conjugués µg / 100 ml	β-glycuroni- dase/ml d'ex- trait	17-OH-CS libres µg/100 ml	OBSERVATIONS
DEL..	F	10	8.5	300 u		Normal
			6.5			
		10	5	100	6	
			6.5			
			12.5	100 + cys- téine ^{**}		
HOLD..	F	9	5	300	18.7	"
GOUR..	F	9	8.5	600		
GROLL..	M	9	10	150 + cys- téine	16 .	"
COQ..	M	11	10	600	10.8	sang sus-hépatique
			6.6	300	8.5	sang veineux péri- phérique
						prélevés extempo- ranément.
ZACH..	F	9	7.8	500	15.5	
HOLD..	F	10	11.9	300	11.5	
		9	10.6	300	14	

* β-glycuronidase purifiée à partir du suc total "d'Hélix Pomatia"

** Cystéine : 4 mg/ml d'extrait à hydrolyser.

TABLERAU N° 20 - Taux comparatifs des 17-OH-CS conjugués et
libres observés avec notre méthode chez
quelques sujets normaux.

Q

B - TEST à l'ACTH

I) - Chez le sujet normal, après perfusion de 25 unités d'ACTH Armour ou Endopancrine pendant 8 heures, le taux des 17-hydroxycorticostéroïdes libres, atteint 43 µg / 100 ml. en moyenne, à la fin de la perfusion quelque soit le taux de départ. (tableau n° 21).

La hausse des conjugués est plus modeste, ceux-ci culminant à 20 µg environ. Le pic des conjugués étant en retard par rapport à celui des libres, il serait peut-être opportun de pratiquer un prélèvement supplémentaire une à deux heures après la perfusion. Il est possible dans ces conditions que l'on observe un taux maximum de 25 à 30 µg environ.

Dans un seul de nos cas, la réponse de l'ACTH a été franchement faible : 6 µg avant - 13 µg après perfusion, bien que le taux des stéroïdes ait doublé par rapport à celui de base. Nous n'avons trouvé chez ce patient aucun stigmata d'insuffisance surrénale primaire ou secondaire.

Contrairement aux dosages urinaires où l'augmentation absolue ou en pourcentage des corticoïdes par rapport à l'élimination de base permet d'apprécier la réponse surrénale, nous pensons qu'en matière de dosage plasmatique, c'est la valeur absolue du pic des corticoïdes qui constitue l'élément le plus fidèle de jugement. Dans la grande majorité des cas, le chiffre de 40 µg / 100 ml. pour les libres représente la réponse normale de la surrénale au test à l'ACTH intra-veineuse.

Ces résultats sont confirmés par ceux des autres auteurs comme nous le verrons au chapitre suivant.

II - En pathologie. Nous n'avons pas encore d'expérience suffisamment étendue de la réponse des corticoïdes plasmatiques après stimulation à l'ACTH au cours des endocrinopathies pour en faire valablement état.

Les premiers résultats de nos dosages sont consignés dans les tableaux n° 21 et 22.

Les résultats de nos premiers dosages au cours des endocrinopathies sont consignés dans le tableau suivant :

NOIS	SEXES	Heure	17 OH-CS conjugués µg/100 ml	β-Glycuronidase d'extrait u/ml	17 OH-CS libres µg/100 ml	OBSERVATIONS	
GUER.	F	10	29,8	1 000	34	Cushing avant surrénalectomie bilatérale subtotale.	
					161	Sang veineux surrénal prélevé pendant l'intervention.	
			37,7	100	37	13 jours après l'intervention. 15 mg F/jour à titre substitutif.	
		9	45	300			
			46	150 + cystéine			
		10	7,5	300	9,7	3 semaines après intervention. F = 10 mg/j.	
					10,9	dernière prise 24 h. avant	
		9	37,8	400	29	4 semaines après intervention. F arrêtée depuis 3 jours.	
LEST	F	9	6,2	500	18	Métastase hypophysaire d'un K au sein. Diabète insipide. Pas d'insuffisance antéhypophysaire.	
GIL.	M	8	1er Avant	6,3	300	11	Panhypopituitarisme cliniquement discret.
			ACTH	8,7	300	13	1er ACTH IV 25 mg 8 hres
		16	1er Après				
			ACTH	11,8	250	37	
					43		
		8	Av ^t 2e				
			ACTH	9,6	1000	4	
			Ap. 2e				
			ACTH	25,9	500	48	2e ACTH IV " " "
MAD.	F		Av ^t ACTH	6,2	500	20	
			Ap. ACTH				Aménorrhée secondaire (hypothalamique)
			20				
			20,8		50		

* β-Glycuronidase purifiée à partir de suc total "d'Hélix Pomatia".

** Cystéine - 4 mg/ml d'extrait à hydrolyser.

TABEAU N° 22 - Taux comparatifs des 17-OH-CS conjugués et libres observés avec notre méthode dans 4 cas de maladies endocriniennes (Cushing; Diabète Insipide, Panhypopituitarisme, Aménorrhée secondaire.).

C - STRESS.

D'une manière générale, tout stress clinique s'accompagne d'une élévation marquée des 17-hydroxycorticostéroïdes, égale ou même souvent supérieure à celle observée après ACTH. Nos constatations corroborent celles déjà faites par d'autres auteurs. (DOBRINER - CHRISTY)

Ainsi dans trois cas d'œdème aigu pulmonaire, nous avons trouvé des chiffres de l'ordre de 52, 50 et 64 µg / 100 ml.

Dans un état de mal asthmatique, les corticostéroïdes libres étaient à 48 µg / 100 ml. avant tout traitement.

D - DIVERS.

Chez plusieurs obèses, (sans signes cliniques d'hypercorticisme), les taux observés ont été tout à fait normaux : 5, 11.5, 16 µg. Un test à l'ACTH intra-veineuse fait chez deux d'entre eux, a montré une réponse faible (26,5 µg) et une réponse normale (39,5 µg).

2 cas de syndrome de Cushing ont été étudiés. Le premier, avait un taux de base à la limite supérieure à la normale. (20 µg). Le second, avait un taux de corticostéroïdes nettement augmenté. (34 µg). Dans les deux cas, les corticoïdes conjugués étaient élevés (29,8 et 37,7 µg).

La deuxième malade a subi une surrénalectomie bilatérale sub-totale. Il a fallu attendre 15 à 20 jours environ pour observer un retour à la normale des 17-hydroxycorticostéroïdes libres et conjugués. (9,7 - 10,9 pour les libres, 7,5 pour les conjugués). Mais un mois après l'intervention, alors que l'hydrocortisone de substitution était suspendue depuis trois jours, le taux des corticostéroïdes plasmatiques libres et conjugués était remonté, à 29 et 37,8 µg respectivement. La rechute biologique s'associait déjà à une rechute clinique, discrète d'ailleurs. Les résultats des dosages urinaires ont montré une évolution parallèle à celle des dosages plasmatiques. (cf. tableau n° 22).

Les mêmes faits ont été constatés par d'autres auteurs sur une grande échelle comme en font foi les travaux de WALLACE, CHRISTY, JAILER, notamment. (cf. chap. IV - tableau N° 24)

Dans les polyglobulies primitives (maladie de VAQUEZ) les chiffres observés ont été toujours normaux : 11, 16, 13, 9 $\mu\text{g}/100\text{ ml}$. Chez ces malades dont les globules rouges oscillaient entre 6 500 000 et 8 000 000, il ne semble pas y avoir de captation exagérée de l'hydrocortisone par les globules rouges anormalement augmentés en nombre.

Môle hydatiforme : Nous avons eu l'occasion de doser les 17-hydroxycorticostéroïdes libres dans deux cas de môles ; les résultats des dosages sont consignés dans le tableau N° 23. Malgré leur caractère malheureusement trop parcellaire, ils font apparaître dans les deux cas une augmentation importante des 17-hydroxycorticostéroïdes libres qui, chez la deuxième malade, ne disparaît que quelques semaines après l'avortement molaire. Fait important, l'évolution des corticoïdes libres est parallèle à celle des prolans.

La première malade n'a pu être suivie plus longtemps, et a subi une hystérectomie d'urgence en ville dans des circonstances mal définies. Le taux de ses 17-hydroxycorticostéroïdes libres n'avait pas diminué après l'avortement molaire comme d'ailleurs celui de ses prolans.

Déjà cliniquement, où la symptomatologie évoque parfois une hyperthyroïdisme, plus encore biologiquement, la môle hydatiforme apparaît comme un exemple schématique de syndrome hyper-hormonal portant sur deux groupes hormonaux au moins, les prolans, et les 17-hydroxycorticostéroïdes.

Ces cas, bien que rares, mériteraient des études approfondies sur la cause de cette inflation polyhormonale. Celle-ci est-elle directement liée à l'hypertonie des centres nerveux avec mise en route secondaire du relais hypophysaire ou bien est-elle d'origine placentaire ? Notons en passant que dans le cas de Mme AND..., bien que les premiers symptômes cliniques soient apparus sept semaines avant l'avortement molaire, aucun signe d'hypercorticisme n'existait à l'examen de la malade. Là encore, la liaison stéroïde-protéine était intervenue peut-être pour inactiver les 17-hydroxycorticostéroïdes en excès.

MOIS :	AGE de :	DATE de :	NATURE du :	Jours par rapport à						OBSERVATIONS
:	la Gros-	l'Avor-	dosage	l'Avortement						:
:	sesse	tement :	:	-4	3	5	13	:	:	
:	avant	Molaire :	:	(				:	:	
:	avortem ^t	:	:	avortement				:	:	
:	:	:	:	molaire)				:	:	
AND.	23e	26.11.	FSH*						Ovaires polykys-	
:	semaine	58	u/ 24h		60000	> 5000	10000		tiques.	
:	:	:	17-OH-CS			<10000			Hystérectomie to-	
:	:	:	µg/100 ml			u.la-	u.lapines		tale le 31.1.59	
:	:	:	:			pines			Malade perdue de	
:	:	:	:	69		27	33		vue depuis	
:	:	:	:						:	
:	:	:	:	0	3	16	40	70	110	
:	:	:	:						:	
ARS.	24e	10.12.	FSH	>25000	>100000	>10000	<1250		:	
:	:	58	u/24h	<50000	<150000	<5000			:	
:	:	:	:	u.lap.	u.i.	u.i.	u.i.		:	
:	:	:	17-OH-CS						:	
:	:	:	µg/100 ml		32	5		12,5	:	
:	:	:	:						:	
:	:	:	:						:	

TABLEAU N° 23 - Evolution comparée des FSH urinaires et des
17-OH-CS plasmatiques libres chez 2 malades
ayant fait un avortement molaire.

* Les dosages de F.S.H. ont été pour la plupart effectués au laboratoire d'hormonologie du Professeur Agrégé THOYER-ROZAT, Hopital Beaujon.

De toute façon, d'autres cas de même devront être étudiés avant de conclure, en effet, l'augmentation des 17-hydroxycorticostéroïdes que nous avons observée n'a peut-être pas de signification physiopathologique particulière, car il s'agissait dans les deux cas de même; parvenues au 5e, 6e mois environ de leur évolution. Dans ces conditions, il est possible que l'élévation des 17-hydroxycorticostéroïdes s'apparente à celle du dernier trimestre de la grossesse, (comme d'ailleurs leur retour à la normale après avortement).

CHAPITRE IV

APPLICATIONS CLINIQUES

Parmi les facteurs susceptibles de retentir de façon importante sur les 17-Hydroxycorticostéroïdes, il en est 4 essentiels :

- A. - La Surrénale
- B. - Le Foie
- C. - Le Rein
- D. - Le Stress

Plus accessoires, en apparence, seraient les dysprotéinémies, les troubles thyroïdiens.

Reste enfin un facteur capital, par sa "capacité" d'utilisation tout au moins, c'est le récepteur tissulaire.

A. - LA SURRÉNALE

L'activité surrénale normale peut être étudiée d'abord par la mesure comparative de la sécrétion des 17-Hydroxycorticostéroïdes et de la Corticostérone.

I. - LE RAPPORT HYDROCORTISONE :

CORTICOSTÉRONE

Certains auteurs se sont attachés à mesurer le rapport $\frac{\text{Hydrocortisone}}{\text{Corticostérone}}$ ($\frac{F}{D}$). La corticostérone en effet représente à côté de l'hydrocortisone et de l'aldostérone une des principales hormones corticosurrénales. Ainsi, la sécrétion de ces deux hormones constitue-t-elle un bon reflet de l'activité surrénale.

Les valeurs du rapport $\frac{F}{D}$ sont très variables d'un auteur à l'autre, que la corticostérone soit dosée isolément (S.T.T) ou par différence avec les 17-Hydroxycorticostéroïdes : dosage des formaldéhydes ou des corticoïdes réducteurs totaux par la dinitrophenylhydrazine (DNPH), ou le bleu de tétrazolium, mené parallèlement avec celui des 17-Hydroxycorticostéroïdes.

Le rapport $\frac{F}{B}$ serait pour BUSH et SANDBERG (I, 18) ≥ 5 , et ≥ 4 après ACTH. SWEET et Coll. le donnent égal à 2, (I, 77, 79).

Ces variations importantes du rapport $\frac{F}{B}$ sont liées en grande partie aux techniques de dosage de la corticostérone. En effet, alors que les différentes méthodes de dosage de l'hydrocortisone donnent des chiffres très concordants, il existe, d'une technique à l'autre, des différences nettes pour la corticostérone. Ainsi MORRIS et WILLIAMS (I, 52) trouvent par polarographie de 4 à 10,5 $\mu\text{g}/100\text{ ml}$ et de 7,8 à 15,8 μg après BT et identification en UV.

WEICHSELBAUM et Coll. (I, 93) avec le BT donnent $8,9 \pm 2,3\ \mu\text{g}$

SWEET (I, 77), par fluorescence, obtient $4,3 \pm 2,3\ \mu\text{g}$

et BUSH (I, 18) $2\ \mu\text{g}$ ou moins.

Ces valeurs, très divergentes, du fait en partie de certains chromogènes qui peuvent être confondus en UV et en BT, expliquent les variations observées du rapport $\frac{F}{B}$.

Il est curieux enfin de noter, comme l'indiquent PETERSON (I, 59) DULH et SANDBERG (I, 18) que ce rapport diminue après ACTH (13/1 avant ACTH $\rightarrow$ 3 à 5/1 après ACTH.). En effet, l'ACTH stimulant surtout la sécrétion des 17-Hydroxycorticostéroïdes et des 17-cétostéroïdes, le rapport devrait augmenter après ACTH.

II. - A.C.T.H.

Associé à l'étude des sécrétions ou élimination de base, l'épreuve à l'ACTH constitue actuellement le meilleur instrument pour tester l'activité et la réactivité de la glande. Comme pour les urines, ce test nécessite des conditions techniques rigoureuses et fixes. Les prélèvements sanguins seront faits juste avant le début de l'épreuve, au milieu (éventuellement) et à la fin de celle-ci.

a) le type d'ACTH employé est variable.

α) ACTH non retard : ELK-HES et Coll. (I, 22, 23, 24) ont expérimenté

différentes préparations d'ACTH : Armour, Upjohn, Actwood, Wilson, Nyce, Li. Ils n'ont pas observé de différence entre elles à la dose de 25 unités. Mais cette dose constituant un appert massif, il n'est pas impossible qu'à des doses plus physiologiques, une certaine variation d'action s'observe entre ces différentes préparations.

§) ACTH retard : GELLER et Coll. (IV, 34) ont comparé l'action de l'ACTH-Zn, et l'ACTH gel après une seule injection intra-musculaire de 40 unités. Dans les deux cas, l'augmentation des 17-Hydroxycorticostéroïdes est de 2 à 3 fois supérieure à la normale. Si l'ACTH-Zn ou gel ont la même activité immédiate, l'activité secondaire de l'ACTH-Zn est plus soutenue (fig. n° 12).

b) Quantité d'ACTH

La quantité d'ACTH capable d'induire la réponse maximum de la surrénale est très inférieure à celle habituellement utilisée (25 unités). BAYLISS (IV, 3 a) a démontré qu'une unité d'ACTH en solution aqueuse perfusée par heure donnait une réponse maximum de la surrénale. THORN propose deux unités/heure (IV, 74, 75) d'ACTH en solution aqueuse.

La dose couramment employée est en fait de 25 unités.

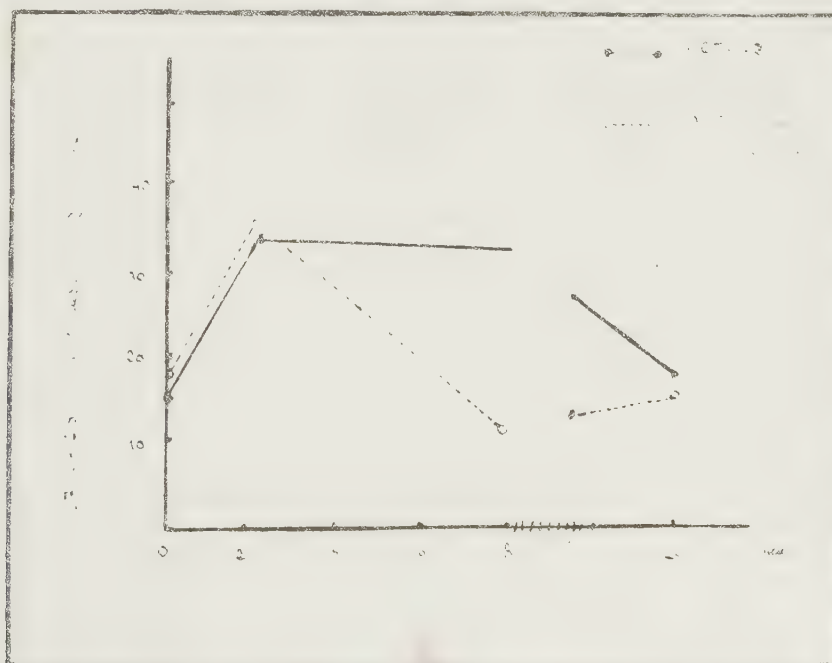


Fig. 12. - Variations comparatives des 17-OH.CS après une injection intra-musculaire de 40 unités d'ACTH-Zinc et d'ACTH-gel. (d'après GELLER et Coll.)

c) Mode d'introduction

α) Voie intra-veineuse : EIKNES et Coll. (IV, 22, 24) après perfusion observent le pic des 17-Hydroxycorticostéroïdes à la 6ème heure, et trouvent paradoxalement que la perfusion entraîne un effet plus prolongé que la voie intra-musculaire. La destruction ou la séquestration de l'ACTH au niveau du muscle leur paraît possible. Aussi adoptent-ils pour le sang la perfusion continue pendant six heures de 25 unités I d'ACTH Armour. Ils notent enfin que la réponse avec le même ACTH chez le même sujet est très variable, si bien qu'en définitive, le test continu pendant 48 heures conférerait pour eux plus de garantie.

β) Voie intra-musculaire : Certes, la voie intra-veineuse apporte la certitude que l'ACTH a été quantitativement administrée en totalité. Si la voie intra-musculaire est plus facile et permet surtout un test ambulatoire, il faut craindre des inégalités de résorption et d'utilisation, déjà signalées par RENOLD et Coll. en 1952. On peut obvier à cet inconvénient par l'injection à douze heures d'intervalle en deux endroits différents, muscle fessier et deltoïde, de 40 UI de corticotrophine retard (JAYLE).

d) Interprétation

Quelle que soit la technique adoptée, l'interprétation des résultats appelle quelques commentaires.

- Dans l'estimation de la réactivité surrénale, nous pensons qu'il ne faut tenir compte ni de l'augmentation brute de la sécrétion des 17-Hydroxycorticostéroïdes, ni du pourcentage d'augmentation, par rapport au taux de base.

En effet, l'élimination de base des 17-Hydroxycorticostéroïdes plasmatiques est variable d'un sujet à l'autre selon l'heure de la journée, et selon la technique de dosage utilisée. Dès l'instant où il est admis des normes très dispersées de sécrétion des 17-Hydroxycorticostéroïdes libres (10 à 25, 5 à 20 µg) l'estimation de la réponse de la surrénale jugée par rapport à un taux de

est caduque.

Contrairement à ce que l'on fait habituellement pour les urines, il nous paraît préférable de juger cette réponse sur la valeur absolue du chiffre des 17-Hydroxycorticostéroïdes libres observés à la 4ème, 6ème ou 8ème heure, selon le type de perfusion adopté. Ainsi le chiffre de 40 μg de 17-Hydroxycorticostéroïdes libres nous semble constituer la réponse normale de la corticosurrénale à la stimulation par l'ACTH intra-veineuse (25 UI/8 heures). CHRISTY et Coll. (IV, 17) trouvent chez des sujets normaux après stimulation par voie veineuse de 4 heures un pic à 32-54 μg indépendant du taux de départ (4 à 23 μg). DOBRINER (IV, 19) insiste également sur le fait que le degré et le type de la réponse à l'ACTH sont indépendants de la sécrétion de base des 17-Hydroxycorticostéroïdes.

- En fait, l'appréciation de la réactivité surrénale sur le seul pic des 17-Hydroxycorticostéroïdes plasmatiques après ACTH constitue un jugement un peu hâtif. L'épreuve à l'ACTH intra-veineuse n'exprime en effet que la réponse rapide, sinon instantanée, du moins assez brève de la surrénale à une stimulation. Elle ne reflète guère le potentiel sécrétoire réel de la surrénale, c'est-à-dire ses possibilités de poursuivre son effort sécrétoire. A cet égard, l'épreuve à l'ACTH retard intra-musculaire avec deux injections à 12 heures d'intervalle serait plus fidèle.

- Bien plus, les doses de corticotrophine employées sont massives, nettement supra-physiologiques. Une épreuve fonctionnelle dynamique devrait s'efforcer de réaliser une stimulation aussi physiologique que possible. Là où en principe 2 unités/heure d'ACTH ^{en} suffisent, on emploie couramment le double.

- Enfin, WEICHSELBAUM (IV, 82, 83) et Coll. y mettent fort justement l'accent, la réaction de PORTER-SILBER souvent utilisée dose aussi bien l'hydrocortisone, la 11-déhydro-17-hydroxycorticostérone (hormone S), la cortisone natives que leurs métabolites conjugués inactifs.

Seule devrait compter dans l'appréciation du fonctionnement surrénal, l'étude des stéroïdes biologiquement actifs. Ces stéroïdes actifs possèdent tous le groupement $\Delta-4, 3-\text{CO}$. Aussi WEICHSELBAUM et Coll. ont-ils proposé de comparer, avant et après ACTH, la sécrétion des stéroïdes par la réaction de PORTER-SILBER, la réaction au bleu de tétrazolium, et celle à l'INH. Cette dernière réaction, moins

spécifique que celle de PORTER-SILBER, réagit avec tous les stéroïdes porteurs d'un groupement $\Delta 4-3-CO$ dont certains sont PORTER-SILBER négatifs : par exemple, les 20 OH-17-Hydroxycorticostéroïdes du type composé I de REICHSTEIN. Ces dosages en quelque sorte croisés permettent certainement de mieux définir quantitativement et qualitativement la réponse de la surrénale. Malheureusement, ils ne sont guère applicables à un examen qui se veut de routine.

- Le point de vue qualitatif de la réponse surrénale doit être d'autant moins négligé que certaines expériences font suspecter une réponse non univoque de la surrénale en fonction du Stress.

Ainsi, KASS et Coll. (14, 45) auraient noté chez le lapin normal (dont le sang ne contient pratiquement que de la corticostérone) un rapport $\frac{F}{B} = 1/2$ après administration d'ACTH pendant 15 jours consécutifs, puis $\frac{4}{1}$ après 28 jours d'ACTH. Fait important, une dose unique courante d'ACTH majore les taux de l'hydrocortisone et de la corticostérone sans altérer leur rapport qui est d'environ $\frac{1}{10}$. De plus, d'autres composants non identifiés auraient été décelés.

Pour ces auteurs, la nature qualitative de la sécrétion surrénale ne paraît donc pas nécessairement fixée génétiquement. L'ACTH aurait une double action :

- la première, rapide, directe, majore sans l'altérer la sécrétion basale.
- La deuxième, retardée, avec modification de la formule de base, et possibilité d'effets pathologiques ou physiologiques secondaires.

Si, dans une certaine mesure, la taille des surrénales, la masse musculaire de l'individu, et surtout des facteurs génétiques et métaboliques complexes dessinent le profil sécrétoire de la surrénale, celui-ci n'est pas immuable en forme et fond. C'est même au contraire, cette aptitude hautement et intrinsèquement réactionnelle, qui constitue finalement l'image réelle du rôle de la surrénale, à l'état normal comme pathologique.

En pathologie en effet, ~~se~~ observent des modifications profondes des 17-Hydroxycorticostéroïdes.

On peut schématiquement distinguer les Hyper et les Hypocorticismes.

III. - LES HYPERCORTICISMES.

a) L'étude des 17-Hydroxycorticostéroïdes sanguins est venue confirmer ce que les dosages urinaux nous avaient appris.

α) L'augmentation des 17-Hydroxycorticostéroïdes est le plus souvent franche, supérieure à $25 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$ ($33 \pm 8 \mu\text{g}$ pour PERKOFF et Coll.) pour les 17-Hydroxycorticostéroïdes libres (IV, 57).

En cas de tumeur surrénale, les chiffres sont notablement plus élevés : $64 \pm 18 \mu\text{g}$ (PERKOFF).

Les 17-Hydroxycorticostéroïdes conjugués sont également augmentés, dans les mêmes proportions.

Le dosage sanguin a un avantage sur celui des urines en cas d'insuffisance rénale avec diminution de l'élimination urinaire des 24 heures.

β) Lorsque l'augmentation des 17-Hydroxycorticostéroïdes n'est pas significative - étant donné les importantes variations propres au rythme nyctéméral d'une part, et à la technique de dosage utilisée d'autre part, l'épreuve à l'ACTH I.V. ou I.M. lève les doutes : la réponse de la surrénale est supérieure à la normale, donnant un pic supérieur à $80 \mu\text{g}$ par exemple. Cette épreuve a de plus le mérite de faire suspecter dans une certaine mesure le type anatomique de la lésion surrénale.

- En effet, en cas d'hyperplasie bilatérale, la réponse de la surrénale est franche, très au-dessus des valeurs habituellement observées.

Le plafond de 40 à $50 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$ pour les 17-Hydroxycorticostéroïdes libres et de $30 \mu\text{g}$ pour les conjugués est nettement dépassé, les chiffres pouvant atteindre 80 à $100 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$ à la 6ème, 8ème heure d'une perfusion

veineuse de 25 U. d'ACTH,

- A l'opposé, les Tumeurs malignes, qui ont en règle une sécrétion de base élevée, sont insensibles à l'ACTH ; le chiffre des 17-Hydroxycorticostéroïdes n'augmente pas sous ACTH. Ce fait, bien qu'incertain, a une certaine valeur d'orientation.

- Entre ces deux extrêmes, se situent les Adénomes dont la réponse est souvent peu franche, à mi-chemin entre les 2 types anatomo-cliniques précédents. (Cf. Tableau n° 24).

Malades	Corticoides urinaires (μ g/24 heures)	(a) 17-OH-CS plasmatiques (μ g/100 ml) avant interv.	17-OH-CS plasmatiques après surréc- tomie unilat.		17-OH-CS plasmatiques après surréc- tomie bilatérale	
			Jours post- opératoires (μ g/100 ml)	Jours post- opératoires (μ g/100 ml)		
A. - Hyperplasie surrénale						
C.P.	15.5	37	14	18	22	0 (b)
			150	29		
A.D.	7.6 ; 15.5	38-44	18	17	24	12
			35	34	48	12
F.C.	3.5 ; 3.4 ; 4.6					
	3.0 ; 3.9 ; 6.0	37-44	45	10	-	-
K.K.	47.8	92-107				
S.B.	19.5	-	360	41-46	15	14
S.Bl.	19.2	34-38	7	24	-	-
B. - Adénome surrénal						
P.T.	5.8 ; 8.4	29-35	12	5		
C. - Cœcénome surrénal						
A.S.	19.3	-	-	15-57		
I.S.	18.6 ; 9.1	31-39	35	26	-	-
			65	12		

a) chromogènes PORTER-SILBERT après hydrolyse par l' α -glycouronidase (normale : 3.9 μ g/24 h.)

b) Echantillon prélevé à un moment où le malade présentait une insuffisance surrénale clinique.

c) Taux plasmatiques et urinaires mesurés le même jour.

TABLEAU n° 24. - 17-OH-CS plasmatiques et urinaires dans le syndrome de Cushing.

(D'après MALLACE, CHRISTY-JAILLER).

Y) Si ces faits sont peut-être un peu trop schématisés, si l'étude des autres sécrétions surrénales s'avère indispensable - existence d'une sécrétion pure ou "panachée" - ils n'en ont pas moins une très grande valeur pratique. Encore faut-il, en matière d'ACTH, veiller à certaines garanties c'est-à-dire :

- utiliser un produit d'activité certaine et constante.

- employer une technique rigoureuse, bien codifiée, et testée chez des sujets normaux, par exemple

: Perfusion veineuse de 25 mg d'ACTH en 6 heures ou 8 heures, avec recueil des échantillons plasmatiques avant et à la fin de l'épreuve.

: ou épreuve IM = double injection de 40 U I.M. d'ACTH retard, l'une dans la fesse, l'autre dans le deltoïde à 12 heures d'intervalle avec recueil du sang au début et à la 24ème heure de l'épreuve par exemple, la double injection obviant pour une part aux irrégularités de résorption parfois observées après ACTH I.M.

b) Le dosage sanguin des 17-Hydrocorticostéroïdes, au même titre que celui des urines, permettra de suivre l'évolution.

a) en cas de maladie ou de syndrome de CUSHING, le retour à la normale des 17-Hydroxycorticostéroïdes après surrénalectomie bilatérale subtotala nécessite certains délais, une à 3 semaines ; la remontée des chiffres doit faire craindre soit une métastase en cas de tumeur maligne, soit l'existence d'une surrénale aberrante, ou encore l'hyperplasie des moignons surrénaux laissés en place. PERKOFF (IV, 57) cite un cas d'hyperplasie surrénale bilatérale où le chiffre des 17-Hydroxycorticostéroïdes tombé à 13 μ g après surrénalectomie partielle gauche, est remonté à 30 μ g 3 mois après, et a finalement chuté à 5 μ g après surrénalectomie droite totale.

Dans un cas de syndrome de CUSHING que nous avons étudié,

les chiffres respectifs des 17-Hydroxycorticostéroïdes libres et conjugués étaient respectivement de 34 et 20 µg avant surrénalectomie bilatérale subtotale ; 3 semaines après l'intervention, ils étaient tombés à 10 et 7,5 µg ; la rechute clinique a été précédée d'une élévation de l'élimination urinaire, corroborée par les dosages plasmatiques : 29 et 37,8 µg . (cf tableau n° 23).

§) Dans les hypercorticismes dissociés du type hyperplasie surrénale congénitale, les dosages sanguins montrent également la diminution des 17-Hydroxycorticostéroïdes, singulièrement de l'hydrocortisone, conséquence directe du déficit enzymatique causal : absence ou diminution de la 21 ou de la 11- β hydroxylase.

La diminution des 17-Hydroxycorticostéroïdes est en fait modérée, le chiffre de ceux-ci étant à la limite inférieure de la normale : 8 ± 3 µg pour PERKOFF.

Auteurs	Nombre de cas	Valeur des 17-OH-CS (µg/100 ml)
WILLIAMS et Coll. (IV, 81)	9	0-10
BAYLISS et Coll. (IV, 4)	1	3
BONGIOVANNI et Coll. (IV, 10)	(2 7)	(3-8 1)
ELY et Coll. (IV, 26)	5	0-8.3
KELLEY et Coll. (IV, 47)	2	1.6-4.7
PERKOFF et Coll. (IV, 57)	4	5-14

TABLEAU N° 25. - Valeurs des 17-OH-CS plasmatiques dans des cas d'hyperplasie surrénale congénitale.

- d'après WILLIAMS, CHRISTY, JAILER -

IV. - LES HYPOCORTICISMES

- a) Dans les insuffisances surrénales aiguës, les 17-Hydroxycorticostéroïdes plasmatiques sont indosables. Mais, à vrai dire, leur dosage est sans intérêt pratique dans ces cas.
- b) Dans les insuffisances surrénales chroniques primitives, deux éventualités sont possibles :
- ou bien l'insuffisance est totale : on ne trouve pas de 17-Hydroxycorticostéroïde dans le plasma, même après ACTH : c'est le cas des maladies d'Addison authentiques par destruction bilatérale et totale du cortex surrénalien.
 - ou bien, ce qui est fréquent, le taux des 17-Hydroxycorticostéroïdes libres et conjugués, est normal ou sub-normal : $11 \pm 5 \mu\text{g}$ pour PERKOFF et Coll. (IV, 57). Il ne faudrait pas sur de tels chiffres infirmer l'insuffisance surrénale. Ces faits correspondent à une destruction partielle du parenchyme. Il reste suffisamment de cellules saines (1/8 à 1/10 de la totalité) pour assurer une sécrétion de base normale, mais pas assez pour répondre par une augmentation de sécrétion à un stress quelconque. Ainsi, ces malades peuvent mener une vie apparemment normale, en dehors de toute agression, qui les plonge au contraire dans l'insuffisance surrénale aiguë.

Lorsque les résultats du dosage sont équivoques, l'épreuve à l'ACTH permet là encore de conclure. En effet, sous ACTH, le surrénal donne alors une réponse nettement inférieure à la normale : le taux des 17-Hydroxycorticostéroïdes ne s'élève pas ou s'élève peu, (pic à 15-20 μg par exemple) et même s'effondre parfois.

Cet effondrement s'explique assez bien si le surrénal, sous la stimulation de la corticotrophine, a épuisé ses dernières réserves, et si le prélèvement de sang a été effectué quelques heures après la libération massive, mais éphémère, des stéroïdes.

On conçoit ainsi que chez ces malades, l'ACTH puisse engendrer une authentique insuffisance surrénale aiguë. Effectivement, des cas de coll. peus, voire de mort subite, ont été observés par GILBERT DREYFUS, (IV, 37), DE GENNES, PERRULT, en cours ou au décours de la perfusion. S'il est recommandé et possible de faire cette perfusion sous protection de stéroïdes de synthèse fluorés ou méthylés dont la faible quantité administrée (250 à 500 μ g par exemple), n'interfère pas avec l'élimination urinaire (de l'ordre du μ g), une telle pratique est impossible avec le sang. On peut avoir recours à la DOCA dans cette éventualité.

- c) Les insuffisances surrénales chroniques secondaires dites fonctionnelles ou deutéropathiques s'accompagnent en général d'un taux faible ou à la limite inférieure de la normale des 17-Hydroxycorticostéroïdes libres, rarement nul. Là encore, l'épreuve à l'ACTH permet de faire le diagnostic en relevant franchement le niveau de la sécrétion surrénale. Ce fait est encore plus caractéristique si l'élévation de la stéroïdémie (et de la stéroïdurie) n'apparaît qu'à la deuxième, voire à la troisième perfusion de corticotrophine.

Tout se passe comme si le surrénal était "en sommeil", et qu'un effet de sommation soit nécessaire pour le réveiller.

- d) Le métabolisme de l'hydrocortisone a été étudié chez des addisoniens vrais par SANDBERG et Coll. (IV, 63).

Ces malades n'avaient pas de 17-Hydroxycorticostéroïdes décelables dans le plasma, ni d'hormonothérapie substitutive depuis 5 jours minimum, au moment où ils reçurent un μ c d'hydrocortisone marquée. Contrairement à ce que l'en aurait pu penser, le métabolisme de l'hydrocortisone est, chez ces sujets, peu différent de la normale :

- la demi-vie est de 75 minutes au lieu de 80-90.

- la radio-activité plasmatique est paradoxalement très supérieure à la normale. On aurait imaginé au contraire, une disparition plus rapide de l'hydrocortisone du secteur plasmatique chez ces sujets dont les récepteurs sont sévrés en corticoïdes.

Le caractère élevé de la radio-activité plasmatique serait peut-être dû à la contraction nette du secteur plasmatique chez l'addisonien. Si en effet on ramène le volume plasmatique à sa valeur normale, le chiffre de la radio-activité devient normal.

- Faits plus curieux, l'excrétion urinaire des 17-Hydroxycorticostéroïdes est comparable à celle des sujets normaux, et celle des glycuronides plus élevée que la normale. Cette augmentation des glycuronides serait liée, soit à la diminution de la filtration glomérulaire, soit au retard à l'élimination de l'eau, fait bien connu chez l'addisonien, d'où retard à l'excrétion des corticoïdes conjugués.

HELLESON (1, 38) a observé les mêmes faits chez une malade surrénaléctomisée pour cancer du sein. Les conclusions de PETERSON et Coll. sont identiques. Tout se passe comme si le foie de l'addisonien était indifférent aux besoins de la périphérie. (1, 58, 60).

B. - LE FOIE

- Le rôle du foie, absolument primordial dans le métabolisme des stéroïdes, a été récemment élucidé par l'étude des 17-Hydroxycorticostéroïdes libres et conjugués du sang, après surcharge en hydrocortisone marquée ou pas.

C'est là un des chapitres où l'étude des stéroïdes plasmatiques s'est révélée la plus riche d'enseignement.

- A la lumière des travaux actuels, le rôle du foie peut se résumer en deux fonctions principales :

- réduction
- conjugaison.

Un bref rappel de ce rôle permettra de mieux apprécier le trouble existant dans les affections hépatiques.

I. - LA REDUCTION.

Elle s'effectue en deux temps, distincts l'un de l'autre et

sous la dépendance chacun d'un système enzymatique spécifique.

TOMKINS et ISSELBACHER (1, 84) ont démontré que la triphosphopyridine nucléotide réduit la double liaison de l'hydrocortisone, de la cortisone et de quelques autres stéroïdes, pour former leurs dérivés dihydrogénés.

Dans un deuxième temps, un enzyme moins spécifique, la 3-OH-déshydrogénéase réduit les dihydroxycorticostéroïdes en leurs dérivés tétra-hydrogénés.

La première réaction est auto-contrôlée, de sorte que la dihydro-hydrocortisone (H_2F) ne s'accumule pas. La deuxième réaction étant très rapide, la dihydro-hydrocortisone n'est pratiquement pas décelable dans le sang circulant.

II. - La CONJUGAISON.

Elle n'intervient qu'après la réduction : l'hydrocortisone ne peut être conjuguée qu'après avoir été réduite. Cette réduction nécessaire de la double liaison suggère que la conjugaison se fait en C_3 avec l'OH. Nous en avons déjà mentionné les types principaux : glycuco et sulfo-conjugaison, leurs enzymes catalyseurs respectifs : l'acide uridine-diphosphate-glycuconique, présent dans l'extrait de foie, (UDPG) (ISSELBACHER, AXELROD - I, 43) et la 3' phospho-adénosine-5' phospho-sulfate (P/PS) (HILZ et LITWNIK) et leur spécificité.

Fait important, l'action de ces différents enzymes n'est pas réversible.

Il faut noter que le tétrahydro-hydrocortisone conjuguée (H_4FG) est le principal métabolite conjugué du sang, alors que c'est le tétrahydro-cortisone conjuguée (H_4EG) pour les urines. Cette différence curieuse et formelle est peut-être due au rein qui oxyderait le 11-OH de la tétrahydro-hydrocortisone conjuguée en 11-CO avec formation de tétrahydro-cortisone conjuguée.

Enfin, la tétrahydro-cortisone est vraisemblablement immédiatement conjuguée, à la différence de la tétrahydro-hydrocortisone et de la dihydro-cortisone, qui apparaissent plus tard sous forme conjuguée.

Toutes ces données ont été acquises par l'étude des extraits de foie de souris ou de rat, les cultures de cellules hépatiques, et

l'administration de 17-Hydroxycorticostéroïdes variés. (MILLER, SCHNEIDER, HORTS AN, AXELROD I, 43), (ROBBINS et Coll. I, 64), (CASPI et Coll. IV, 10).

Des réserves pouvaient être formulées quant à la validité de l'application à l'homme de ces découvertes. Leur bien-fondé a été prouvé par l'étude des cirrhoses et celle de certains syndromes véritablement expérimentaux, tels la cholestase familiale de GILBERT et le syndrome de CRIGLER-NAJJAR.

III. - DANS LES CIRRHOSIS,

qu'elles soient d'origine virale ou nutritionnelle (éthylque notamment), le fait dominant est le retard à la réduction de l'hydrocortisone.

En effet, les expériences de BROWN et Coll. (IV, 12, 14), chez les cirrhotiques, ont montré, après perfusion d'hydrocortisone (1 mg/Kg de poids) :

- l'augmentation des 17-Hydroxycorticostéroïdes libres plus élevée que chez les sujets normaux.
- la disparition plus lente de l'hydrocortisone, avec apparition retardée des 17-Hydroxycorticostéroïdes conjugués. (Figures n° 13, 14, 15).
- alors que le tétrahydro-hydrocortisone (H_4F) et surtout la tétrahydro-cortisone (H_4E) et le dihydro-cortisone (H_2E) ont une vitesse de disparition normale, avec apparition dans des délais rapides des 17-Hydroxycorticostéroïdes conjugués. (Figure n° 16, 17).

Dans un travail plus récent, ENGLERT et Coll. (IV, 29, 30) ont confirmé ces données.

Ils ont étudié différents types de cirrhoses post-hépatitiques avec ou sans nécrose, nutritionnelles, après contrôle des fonctions hépatiques, notamment de la BSP, et la mesure de la clearance de la créatinine endogène.

Administrant par voie veineuse l'hydrocortisone, la tétrahydro-hydrocortisone, la tétrahydro-cortisone et la dihydrocortisone, ils ont noté :

- que la demi-vie de l'hydrocortisone était augmentée, et que cette augmentation était proportionnelle à la sévérité de l'atteinte hépatique, 222 minutes $\pm$ 19, qu'il y ait ou non ascite.

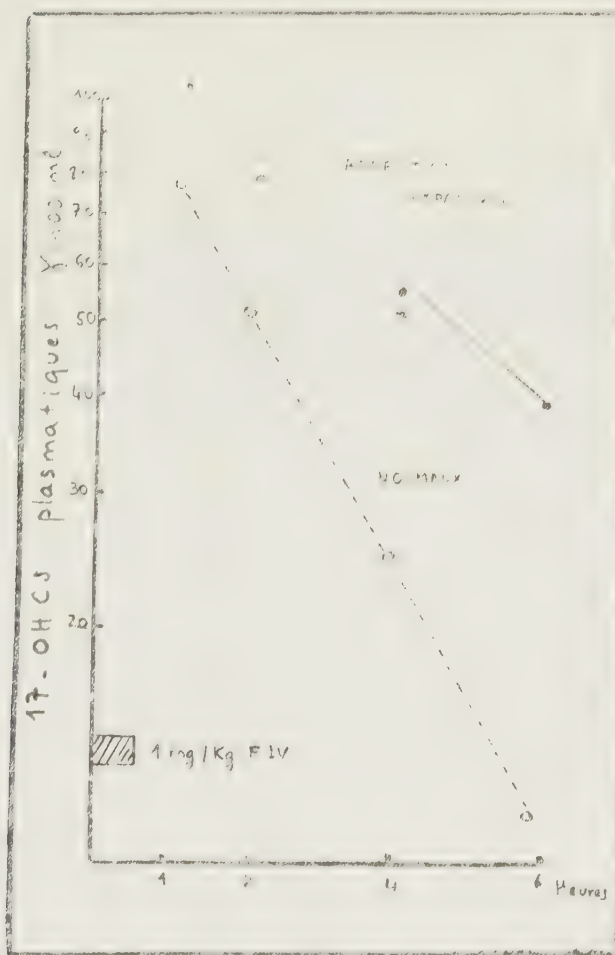


FIG. 13. - Valeurs moyennes comparées des 17-OHCS plasmatiques chez des sujets normaux et hépatiques après perfusion standard pendant 30 mn de F à raison de 1 mg/kg

- D'après BROWN, WILLARDSON, SAMUELS, TYLER.

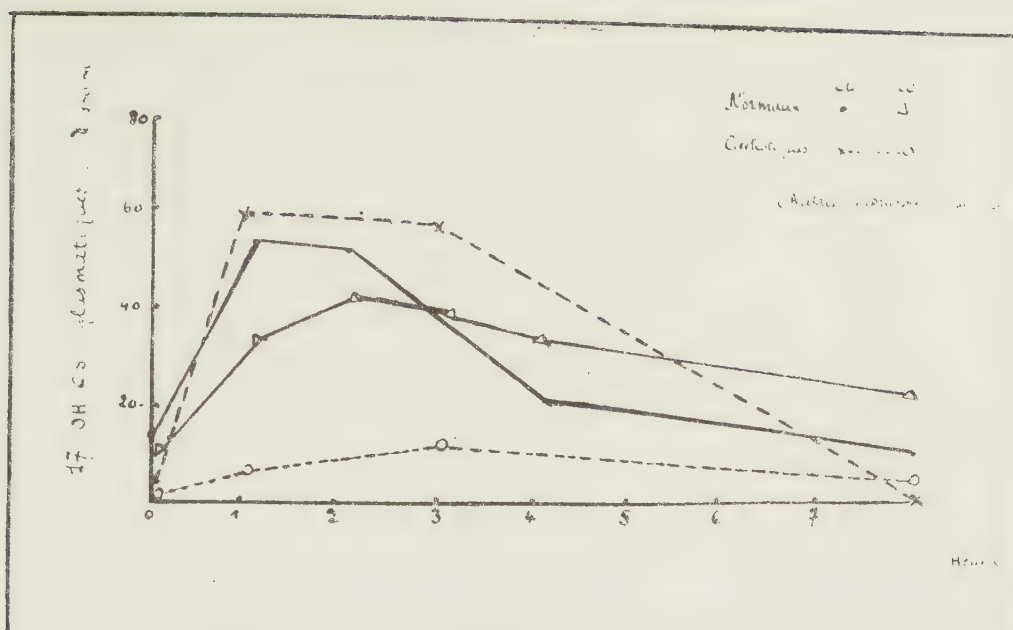


FIG. n° 14. - Comparaison des taux moyens des 17-OHCS libres et conjugués chez 16 adultes normaux et 8 cirrhotiques avant et après injection de 60 mg/m² d'acétate de cortisone. (D'après KLEIN, PAPADATOS).

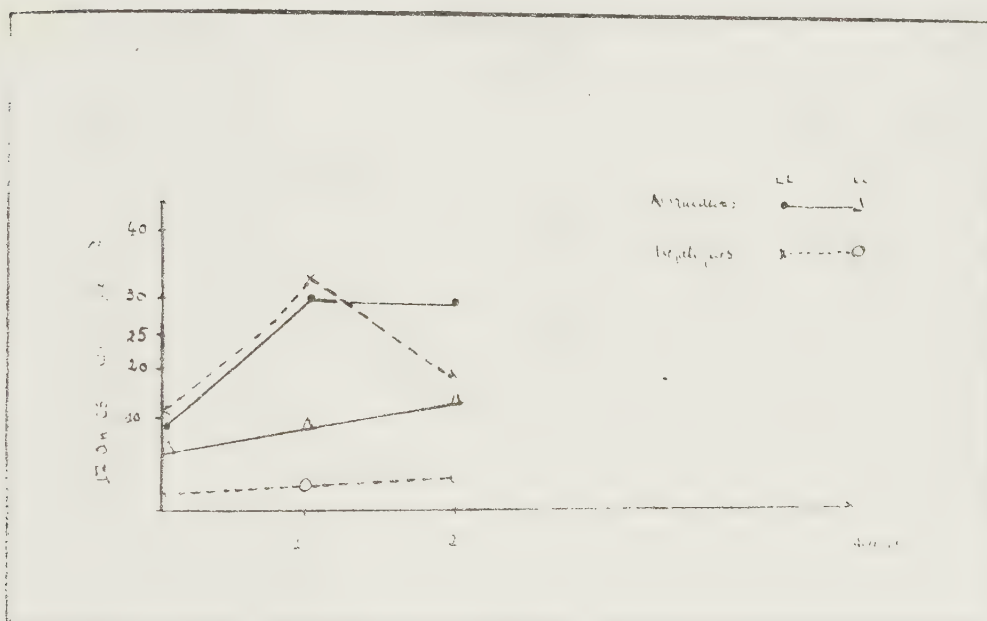


FIG. n° 15. - Comparaison des taux moyens des 17-OHCS libres et conjugués après 10 mg/m² d'ACTH intra-veineux chez des sujets normaux et hépatiques. (D'après KLEIN, PAPADATOS).

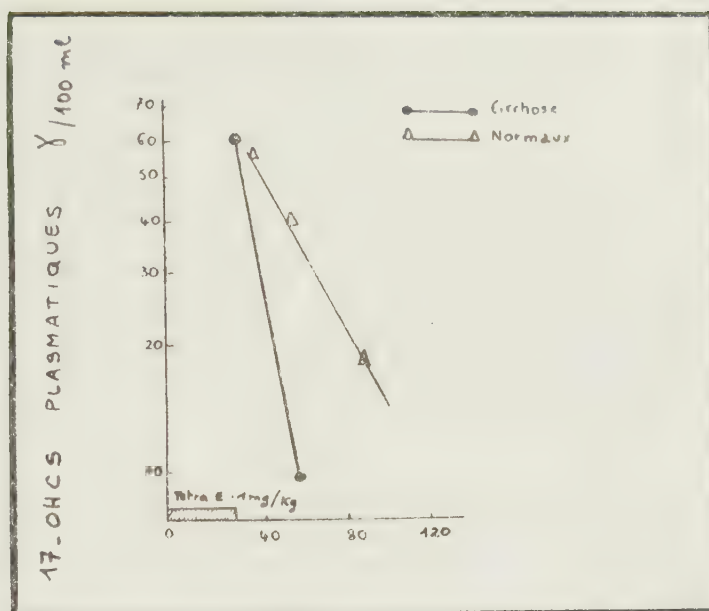


FIG. n° 16. - Taux des 17-OHCS après perfusion de Tetra E pendant 30 minutes à raison de 1 mg/kg.
(D'après BROWN, WILLARDSON, SAMUELS, TYLER)

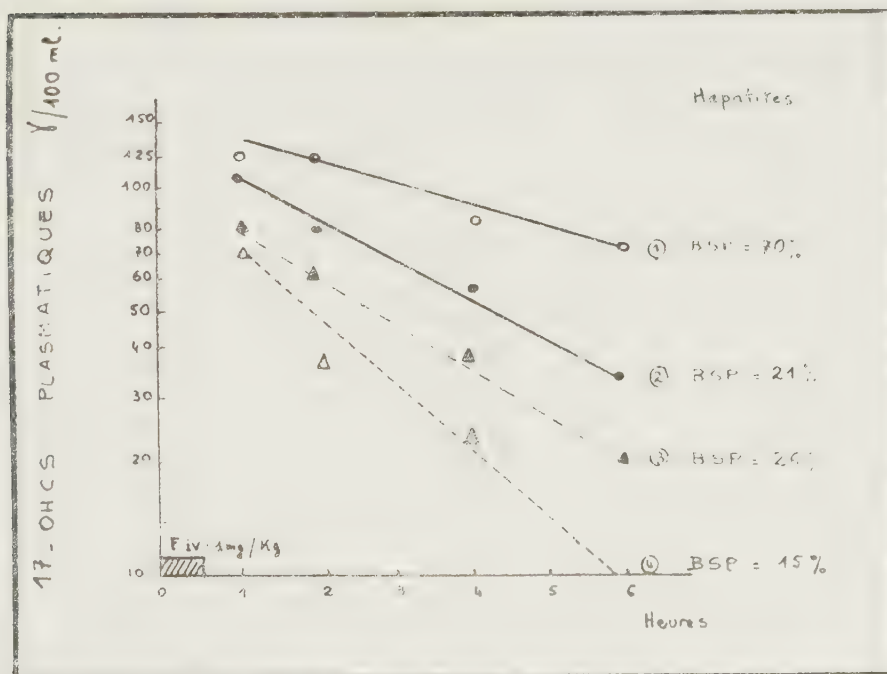


FIG. n° 17. - Taux des 17-OHCS chez deux malades atteints d'hépatite infectieuse, après perfusion de F à deux reprises.
(D'après BROWN, WILLARDSON, SAMUELS, TYLER)

- que le pic des 17-Hydroxycorticostéroïdes conjugués était retardé, inférieur à la normale, ces modifications étant plus importantes dans les cirrhoses avec ascite.

- que la tétrahydro-cortisone, la dihydro-cortisone libres disparaissent plus rapidement que l'hydrocortisone, plus lentement que la normale en cas d'ascite, mais que la tétrahydro-cortisone conjuguée apparaissait très précocement dès la trentième minute, chez les cirrhotiques sans ascite, comme chez les sujets "contrôle". L'existence d'une ascite coïncidait avec un pic de tétrahydro-cortisone conjuguée retardé et faible.

- que la tétrahydro-hydrocortisone avait un destin semblable, quoique plus proche, de celui de l'hydro-cortisone : pic des conjugués à la soixantième minute. Si la tétrahydro-hydrocortisone est plus longue à se conjuguer, c'est précisément parce qu'elle se transforme auparavant en tétrahydro-cortisone.

Ainsi, contrairement à ce que l'on pensait initialement, (KLEIN et Coll. IV, 19), le foie cirrhotique est capable de conjuguer normalement les 17-Hydroxycorticostéroïdes, à condition que ceux-ci lui soient fournis réduits, car il est incapable de les réduire. La réduction du noyau A de la molécule du stéroïde est dans ce cas le seul facteur limitatif de la conjugaison.

Le catabolisme de ces dérivés hydrogénés exogènes est normal - surtout en l'absence d'ascite - et indépendant du degré de l'atteinte hépatique.

A l'opposé, l'augmentation de la demi-vie de l'hydro-cortisone, le retard d'apparition et la diminution des 17-Hydroxycorticostéroïdes, après administration d'hydrocortisone, sont proportionnels à l'atteinte hépatique. (BROWN et SAMUELS, IV, 12 -, BROWN, WILLARDSON et Coll., IV, 14 -, ENGLERT et Coll., IV, 29)

Le foie cirrhotique peut conjuguer, mais ne sait plus réduire les 17-Hydroxycorticostéroïdes.

Reste à expliquer la diminution de la disparition plasmatique des 17-Hydroxycorticostéroïdes libres. ENGLERT et Coll. invoquent 3 facteurs :

- la diminution du flux hépatique chez les cirrhotiques,

- une déviation métabolique de l'hydrocortisone,
- les limites de la réaction de PORTER-SILBER qui ne détecterait que 20 à 30 % des métabolites urinaires.

Quant au rôle apparemment aggravant de l'ascite, il est peut-être dû à l'augmentation du volume de diffusion offert aux stéroïdes conjugués.

IV. - LES DEFICIENCES DE LA GLYCURO-CONJUGATION HEPATIQUE.

Dans de nombreuses circonstances, il existe, à l'opposé des cirrhoses, un déficit de la glycuro-conjugaison.

a) Dans les anémies hémolytiques, par exemple, l'apport pigmentaire au foie est considérablement accru. La capacité hépatique de glycuro-conjugaison est débordée : la bilirubine libre (qui donne la réaction indirecte) ne peut plus être conjuguée et est retenue dans le plasma. Ainsi s'observe une augmentation de la bilirubine indirecte sans bilirubinurie.

Nul doute que dans ce cas, les 17-Hydroxycorticostéroïdes ne puissent être conjugués en totalité.

b) C'est le cas tout particulièrement des maladies caractérisées par un déficit congénital du système enzymatique qui préside à la glycuro-conjugaison.

GILBERT en 1900 décrivit le premier plusieurs cas d'ictère chronique familial non hémolytique acholurique. Il semble qu'actuellement cette maladie doive être dénombrée, et qu'il faille distinguer :

- le syndrome de CRIGLER-NAJJAR découvert en 1952,
- l'ictère familial non hémolytique ou trouble fonctionnel hépatique constitutionnel,
- l'ictère physiologique du nouveau-né,
- l'ictère des prématurés,
- l'ictère non hémolytique congénital des rats de la souche Wistar. (BUTT, IV, 15).

Dans toutes ces maladies, la glycuco-conjugaison hépatique est, sinon totalement absente, du moins très déficiente. De plus, le déficit est variable dans le temps, pouvant parfois disparaître (SCHLID in BUTT, IV, 15). Le manque de glycuco-conjugaison frappe non seulement la bilirubine, mais également les stéroïdes : 17-Hydrocorticostéroïdes, oestrone, progesterone. (ISHLBACHER, PETERSON et SCHLID, in BUTT).

L'étude de ce trouble est aisée avec la progesterone, puisque cette hormone est éliminée en grande partie sous forme glycuco-conjuguée dans la bile. Dans les urines, on ne retrouve que la moitié du taux habituel des 17-Hydroxycorticostéroïdes (PETERSON). La morphine, la sérotonine, et bien d'autres drogues peuvent ne plus être éliminées sous forme glycuco-conjuguée.

Le déficit de la glycuco-conjugaison serait dû à un manque de glycuronyl-transférase, normalement présente dans les microsomes hépatiques. L'absence de cet enzyme peut être génétiquement définitive, ou au contraire provisoirement acquise : cette deuxième éventualité paraît concerner le nourrisson et le prématuré, dont l'équipement enzymatique hépatique, partiel à la naissance, ne se complèterait que vers le dixième jour.

L'absence de glycuco-conjugaison ne paraît pas entraîner de conséquences fâcheuses lorsqu'il s'agit de 17-Hydroxycorticostéroïdes. Il en est autrement pour la bilirubine. Le pigment non conjugué peut se fixer, à partir d'une certaine concentration, sur les noyaux gris centraux et provoquer de graves troubles neurologiques. Il est curieux que la non-conjugaison des 17-Hydroxycorticostéroïdes n'ait pas apparemment, de retentissement secondaire décelable.

En effet, si l'on admet que la conjugaison des 17-Hydroxycorticostéroïdes équivaut à leur inactivation, il est étonnant que la présence d'hormones glucocorticoïdes actives en permanence n'engendre pas, en quelque sorte, un hypercorticisme par insuffisance de dégradation hormonale, à moins d'imaginer soit leur excrétion urinaire accrue, soit la diminution de leur sécrétion par la surrénale. Cette deuxième hypothèse paraît plus vraisemblable, sachant que le taux périphérique des hormones effectrices règle, selon un mécanisme de "feed-back", leur propre sécrétion.

Il serait ainsi intéressant d'étudier la demi-vie et la vitesse de renouvellement de l'hydrocortiso, afin de voir s'il n'existe pas un ralentissement de son métabolisme et un "freinage" de la surrénale.

En fait, le déficit de la glycuco-conjugaison étant rarement total et permanent, la fraction des 17-Hydrocorticostéroïdes non conjugués est relativement minime, et ne devrait pas entraîner une inhibition de la surrénale.

Contrairement à ce qui est noté dans les cirrhoses, la demi-vie de la tétrahydro-cortisone, de la tétrahydro-hydrocortisone et de la dihydro-cortisone, devrait être identique à celle de l'hydrocortisone. Il serait peut-être également utile de vérifier si, par analogie avec la bilirubine, il n'existe pas de mono et de diglycuronide d'hydrocortisone. Cette distinction est importante, car la bile contient 75 % de diglycuronides de bilirubine et seulement 25 % de monoglycuronides. Or les monoglycuronides sont fabriqués hors du foie, et les diglycuronides par le foie lui-même. Les insuffisances hépato-cellulaires graves, l'hépatectomie, entraînent la disparition des diglycuronides et à l'opposé, l'apparition de mono-glycuronide de bilirubine dans le sang. BOLL' A. (in BUTT, IV, 15).

Il ne serait donc pas impossible à priori d'observer tout de même dans certaines cirrhoses un déficit de la glycuco-conjugaison portant exclusivement sur les diglycuronides.

C. - LA BILIE

Nous ne reviendrons pas sur le rôle des reins, déjà envisagé avec l'étude de l'élimination urinaire des 17-Hydroxycorticostéroïdes. L'élimination prépondérante des conjugués est le reflet du déséquilibre des clearances : les 17-Hydroxycorticostéroïdes conjugués, hydrosolubles, ont, comme BONGIOVANNI et Coll. l'ont bien montré, une clearance très supérieure à celle des libres.

Avant d'envisager le retentissement des différentes formes d'insuffisance rénale sur le profil biologique des 17-Hydroxycorticostéroïdes, il faut noter un fait important :

I. - Le franchissement de la barrière rénale.

"Inverse" la formule sanguine de ces corticostéroïdes. En effet, les 17-Hydroxycorticostéroïdes conjugués sont en valeur absolue légèrement inférieurs aux libres dans le sang circulant, alors qu'ils sont environ neuf fois plus élevés dans les urines. La différence des clearances ~~est~~ soulignée, de l'ordre de 1 à 6 en faveur des conjugués, n'explique pas à elle seule une telle inversion. On ne peut manquer de supposer que les cellulaires tubulaires aussi sont capables de conjuguer les 17-Hydroxycorticostéroïdes : ce fait a déjà été démontré sur homogénat de rein. Il serait intéressant d'étudier la demi-vie plasmatique de l'hydrocortisone et de ses métabolites conjugués ainsi que leur élimination urinaire chez des animaux ou des sujets porteurs d'une tubulo-néphrite pure.

II. - Le comportement des 17-Hydroxycorticostéroïdes a été étudié, à défaut de tubulo-néphrite pure, dans les INSUFFISANCES RENALES en général, sans préjuger de leur type anatomo-clinique ni de leur cause.

a) PERKKARINEN et Coll. (IV, 56), KASANIN et Coll. (IV, 46) ont ainsi noté dans les insuffisances rénales :

- une augmentation significative des 17-Hydroxycorticostéroïdes conjugués et libres avec "écrasement" du cycle nyctéméral normal de ces hormones.
- les 17-Hydroxycorticostéroïdes totaux sont doublés le matin : 93, 9 microgrammes au lieu de 40 g, et quadruplés le soir.
- les conjugués sont le triple de la normale le matin : $69 \pm 5,8$ g au lieu de 20, et le quintuple le soir ($53,2 \pm 4,8$ au lieu de 10).
- l'augmentation des conjugués est la plus importante, très supérieure à celle des libres. En effet, les libres sont en règle à la limite supérieure de la normale le matin ($24,9 \pm 2,9$ g) seulement doublés le soir (18 ± 3) (KASANIN).

L'augmentation prédominante des deux catégories de 17-Hydroxycorticostéroïdes explique que le cycle nyctéméral normal soit écrasé (différentiel le matin-soir, diminuée, voire inversée dans un tiers des cas.)

b) Ces mêmes auteurs ont étudié la corrélation éventuelle existant entre le degré de l'insuffisance rénale jugé sur les données cliniques et biologiques d'une part, la rétention des 17-Hydroxycorticostéroïdes et l'effacement du cycle nyctéméral d'autre part.

De leurs expériences, ils concluent qu'il existe une bonne corrélation entre l'augmentation des conjugués (matin et soir) et des libres (soir) d'une part, l'azote non protéique (surtout lorsque celui-ci est supérieur à 0 gr 40/%) et la rétention de la P.S.P. d'autre part.

Ils n'ont pas trouvé de corrélation par contre entre ces tests rénaux et les variations du cycle nyctéméral. Absence totale de corrélation enfin entre les modifications des 17-Hydroxycorticostéroïdes sanguins, l'anémie, la densité spécifique des urines du matin et la tension artérielle diastolique.

Ces résultats appellent des réserves :

- Il faut, et ELKJERINEN et Coll. l'ont suggéré, tenir compte du rôle du foie, du cœur, et des modifications éventuelles des différents secteurs : vasculaire, interstitiel, et intra-cellulaire, de l'organisme.

Ces auteurs auraient dû indiquer dans leur travail l'existence ou non d'œdème, d'une hépatomégalie, d'une défaillance cardiaque.

- Il faudrait, de plus, distinguer glomérulo- et tubulo-néphrite.
- Enfin, une étude précise du fonctionnement rénal ne devrait pas se contenter du dosage de l'urée sanguine et de la mesure de l'élimination de la P.S.P., mais comprendre également une étude des clearances, clearances de la créatinine endogène, du P.A.H., du mannitol, afin de tester séparément le fonctionnement des glomérules et des tubules.

Ce n'est qu'à ce prix que l'on pourrait vraiment comparer le devenir des 17-Hydroxycorticostéroïdes en fonction du degré de l'insuffisance rénale.

Les données de ELKJERINEN, KOSKINEN confirment celles précédemment énoncées par

ENGLERT et Coll. (IV, 28) qui ont également noté la diminution de la clearance glomérulaire et de la demi-vie des conjugués.

La signification de ces faits est discutée. Une élévation permanente et aussi importante des 17-Hydroxycorticostéroïdes comparable à celle observée parfois dans le syndrome de Cushing devrait avoir des effets secondaires fâcheux. Cela ne semble pas être le cas. Il ne faut pas oublier que la rétention porte sur les conjugués qui sont biologiquement inactifs. (DI RAIMONDO, et FORSHAM). D'ailleurs, la production de 17-Hydroxycorticostéroïdes actifs n'est pas augmentée et la sécrétion de ces urates répond normalement à l'ACTH (ENGLERT, IV, 28).

Il n'est donc pas prouvé que l'infiltion des conjugués aggrave les lésions rénales pré-existantes, ni le catabolisme protéidique.

En tout cas, ENGLERT a observé un certain parallélisme entre l'élévation de l'urée, et celle des 17-Hydroxycorticostéroïdes, de même qu'entre leur diminution conjointe lors de l'amélioration de l'insuffisance rénale. Dans une certaine mesure l'augmentation des conjugués et des libres constituerait ainsi un témoin assez fidèle de l'insuffisance rénale.

D. - STRESS

I. - CHIRURGIE. -

L'action du stress chirurgical sur les 17-Hydroxycorticostéroïdes a été très étudiée. Il faut distinguer la période pré-opératoire, l'action de l'anesthésie elle-même, et celle de l'intervention.

- a) période pré-opératoire : FR. KSSON et GEMELL (IV, 32, 33) note une augmentation significative des 17-Hydroxycorticostéroïdes libres immédiatement avant l'intervention, élévation qu'ils attribuent à l'anxiété et à la tension nerveuse. Ces faits n'ont pas été retrouvés par d'autres auteurs, VIRTUE et Coll. notamment (IV, 30) qui concluent que les médications pré-opératoires, les

émotions, et l'appréhension n'ont aucune influence nette.

- b) anesthésie : Pour HELMREICH et Coll. (IV, 39), VIRTUE et Coll. (IV, 80) l'éther entraîne une excretion discrète des 17-Hydrocorticoïdes libres et conjugués dans un tiers des cas. Les autres anesthésiques : cyclopropane, N_2O , Thiopental ne majorent pas l'excretion de ces corticoïdes. Les barbituriques et la rachianesthésie auraient même une action dépressive. SIKER (IV, 68).

Il faut noter enfin l'absence d'influence de l'éther sur la glycuco-conjugaison hépatique des stéroïdes.

- c) intervention et évolution post-opératoire : L'augmentation des 17-Hydroxycorticoïdes libres a été presque constamment retrouvée, importante (50 à 75 µg) parfois très élevée (au-delà de 100 µg), Précoce, entre la première et la quatrième heure pour les libres elle est plus tardive, plus faible pour les conjugués.

Cette augmentation est durable, persistant encore 24 heures après l'intervention. Le retour à la normale se fait habituellement entre le 2ème et le 6ème jour après l'intervention. REICHSTEIN et Coll. (IV, 82, 83), HELMREICH et Coll. (IV, 39), FRANKSSON et Coll. (IV, 32, 33). MOORE et Coll. (IV, 54), STEINBERG et Coll. (IV, 69, 70), SANDBERG et Coll. (IV, 62, 64).

FRANKSSON et Coll. notent une évolution un peu différente dans des délais identiques. L'augmentation des 17-Hydroxycorticoïdes libres atteindrait un plateau stable pendant 36 heures, puis surviendrait une chute assez brutale avec retour à des taux inférieurs à la normale, une remontée plus discrète que l'ascension initiale pendant 48 heures précédant le retour définitif à la normale. Cette évolution serait indépendante du type de l'intervention.

L'élimination urinaire reflète en partie les modifications sanguines L'augmentation de l'élimination dans l'après-midi ou la nuit du

jour de l'intervention, retour à la normale entre le 3ème et le 6ème jour.

Mais l'augmentation des 17-Hydroxycorticostéroïdes plasmatiques n'est pas absolument constante sans pour autant que l'on puisse invoquer une insuffisance surrénale. Dans le cas où elle n'apparaît pas, et en dehors de l'administration de barbituriques ou de l'emploi de la raché-anesthésie, aucune réponse n'a été donnée à ce phénomène. MOORE et Coll. (14, 54).

d) facteurs déterminants :

1. - L'augmentation des 17-Hydroxycorticostéroïdes est en partie contrôlée par l'impact nocu du traumatisme chirurgical, mais plus encore par la durée de l'acte opératoire, comme le montre la figure n° 18.

2. - HELLMICH et Coll. ont comparé l'activité surrénale après Stress chirurgical et après ACTH intraveineux (25 ug/8h.). L'augmentation des 17-Hydroxycorticostéroïdes libres commence dès la 4ème heure, avec retour à la normale ou en dessous de la normale en 24 heures. L'augmentation des conjugués est retardée, le pic ne s'établissant qu'après la perfusion. Ces auteurs font deux remarques :

- pour les libres, les courbes sont identiques, plus élevées cependant en cas de stress chirurgical. D'autre part, le retour à la normale est plus rapide après ACTH.
- pour les conjugués, la normalisation est aussi plus prompte, mais à l'uniformité des réponses à l'ACTH s'oppose la diversité de celles au stress chirurgical, dans l'ensemble plus faibles et retardée, témoignant de la déficience de la conjugaison hépatique.

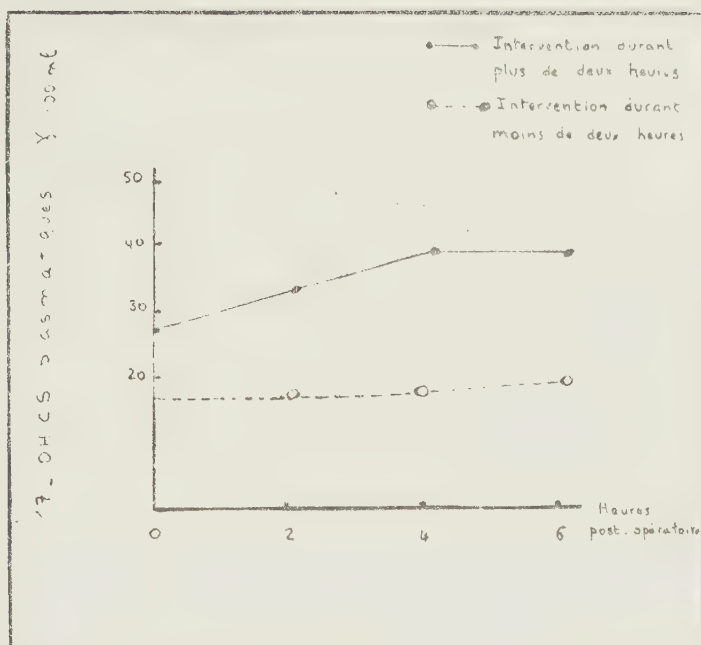


FIG. 13. - Valeurs des 17-OHCS plasmatiques après interventions chirurgicales. (D'après SANDBERG, EIKNES, SAMUELS, TYLER).

3. - TYLER et Coll. (IV, 77) ont essayé de définir le rôle du foie au cours du stress chirurgical. Il y aurait pour eux parallélisme entre l'augmentation des 17-Hydroxycorticostéroïdes libres et la rétention de la B.S.P. En d'autres termes, l'élévation des libres serait d'autant plus importante que le fonctionnement hépatique serait plus perturbé. D'autre part, les altérations de la B.S.P. sont proportionnelles à la durée et à la sévérité de l'acte chirurgical. Mais elles peuvent dépendre de deux facteurs, débit hépatique et fonction cellulaire propre qui n'ont pu être étudiés séparément. Il faut noter en outre que la B.S.P. est étudiée sur une période de 45 minutes, période courte par rapport à celle où les 17-Hydroxycorticostéroïdes sont étudiés après l'intervention (8 heures). Elle représente donc mal le devenir fonctionnel hépatique pendant et après

l'intervention. Enfin le rôle du récepteur tissulaire est indéterminé : l'étude de la différentielle artérioveineuse des 17-Hydroxycorticostéroïdes s'est soldée par un échec.

4. - FRANKSSON et GEMMILL enfin (IV, 33), EULER et Coll (IV, 31), ont démontré que l'augmentation des 17-Hydroxycorticostéroïdes était indépendante de celle de l'adrénaline. D'ailleurs l'interdépendance complète de l'adrénaline et des 17-Hydroxycorticostéroïdes est maintenant prouvée : FRANKSSON et Coll. (IV, 33), TYLER et Coll. (IV, 78), SANDBERG et Coll. (IV, 65).

c) CONCLUSION : L'augmentation des 17-Hydroxycorticostéroïdes est proportionnelle, nous l'avons vu, à la durée du stress chirurgical plus qu'à son intensité. La persistance d'une concentration élevée de corticoïdes libres, au-delà des délais habituels, doit faire craindre l'existence d'une complication. Comme nous le reverrons, l'augmentation des 17-Hydroxycorticostéroïdes est largement supérieure en règle à celle observée après un test à l'ACTH.

L'étude comparée de la sécrétion des glucoc. et des minéralocorticoïdes a déjà été entreprise en 1955 par MOORE et Coll. (IV, 54). Jugant la sécrétion des minéralocorticoïdes sur la rétention de sodium, ils constatent l'absence de corrélation avec la sécrétion des 17-Hydroxycorticostéroïdes, la rétention sodée survivant à la normalisation des 17-Hydroxycorticostéroïdes.

II. - BRULURES. -

Les mêmes constatations ont été faites chez les brûlés. Les 17-Hydroxycorticostéroïdes libres sont considérablement augmentés, d'autant plus que les brûlures sont plus profondes et plus étendues. Ces deux facteurs : degré de la

brûlure, pourcentage de la surface du corps atteinte, ont autant de valeur pronostique que l'augmentation des 17-Hydroxycorticostéroïdes qui, dans les cas graves, est massive. Des chiffres de 104 et 230 μ g/100 ml ont été rapportés par HUMM et Coll. (IV, 41). Ils sont de mauvais pronostic comme ceux, à l'opposé, excessivement bas que l'on note parfois. WILSON et Coll. (IV, 85).

Contrairement aux opérés, et cela se conçoit bien, l'augmentation des 17-Hydroxycorticostéroïdes est beaucoup plus prolongée. Elle persiste 16, 17 jours après le brûlure, témoignant d'un stimulus persistant. Là aussi, l'augmentation prolongée des 17-Hydroxycorticostéroïdes, sans raison clinique patente, doit faire craindre la survenue d'une complication.

Les 17-Hydroxycorticostéroïdes conjugués sont beaucoup moins augmentés, témoins vraisemblables du déficit hépatique également prolongé.

III. - LE STRESS EN CLINIQUE. -

Il est difficile d'établir une hiérarchie qualitative et quantitative du stress.

Le "dépassement" de la réponse surrénale soumise au stress par rapport à l'ACTH exogène, repose le problème de l'unicité ou de la pluralité de l'ACTH. En effet, on ne manque pas d'être surpris de constater que la réponse qualifiée de maximum de la surrénale (telle que la définit par exemple l'épreuve à l'ACTH I.V. 25 ui pendant 6 à 8 heures) ne représente précisément pas le potentiel sécrétoire optimum de la glande. Les exemples abondent en clinique où s'observent des taux considérablement plus élevés que ceux notés après ACTH en dehors de toute hyperplasie ou néoformation de la glande. Au cours de deux œdèmes subaigus pulmonaires chez des cardiaques modérément hypertendus, au cours de crises d'asthme violentes, nous avons trouvé des chiffres excédant souvent 50 μ g. Après intervention chirurgicale, les chiffres avoisinent

70 $\mu\text{g}/100 \text{ ml}$. Après brûlures graves, de 100 à 230 $\mu\text{g}/100 \text{ ml}$.

Or, ces chiffres n'ont jamais pu être atteints avec une perfusion d'ACTH, quelle que soit la dose employée. BAYLISS (IV, 30) THORN (IV, 74, 75), ont fait remarquer d'ailleurs que dans l'épreuve de THORN, la dose de 25 UI/8h. est une dose déjà excessive, puisqu'une réponse identique peut être obtenue avec une à deux unités/Heure I.V. La possibilité d'une différence d'action entre l'ACTH endogène libéré par le Stress et l'ACTH exogène pourrait à la rigueur rendre compte de la divergence de réponse surrénale au stress et à l'ACTH exogène.

Cette hypothèse est en fait, difficile à soutenir dans sa totalité. En effet, après stress chirurgical, alors même que la sécrétion des 17-Hydroxycorticostéroïdes paraît être parvenue à son niveau le plus élevé et définitif, (par exemple 50 μg par 100 ml.) une injection intra-veineuse d'ACTH est capable d'augmenter encore la sécrétion de la surrénale, et ceci dans une proportion égale à celle observée par rapport au niveau de base. La figure empruntée à SANDBERG et Coll. (IV, 64), est très démonstrative à ce sujet.

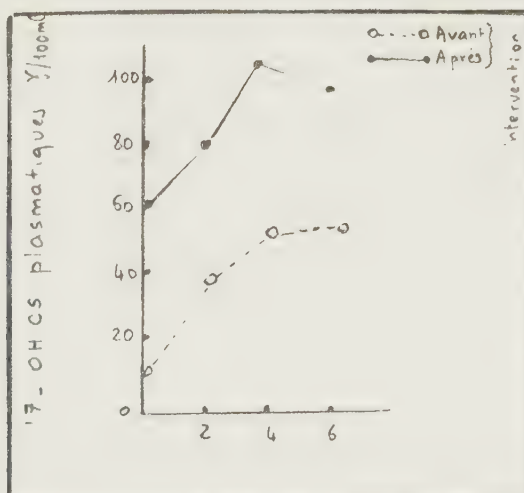


FIG. n° 21. - Réponse des 17-OHCS plasmatiques à la perfusion de 25 mg ACTH pendant 6 heures avant et après intervention.
(D'après SANDBERG, EIKNES, SAMUELS, TYLER)

Dans ces conditions, ou bien ACTH endogène et exogène sont totalement différentes, ou bien il faut faire intervenir la durée du stress : on peut en effet imaginer qu'un stress prolongé entraîne une accumulation progressivement croissante des 17-Hydroxycorticostéroïdes, comme la réaliseraient peut-être la perfusion veineuse continue plusieurs jours de suite d'ACTH, ou des injections intra-musculaires d'ACTH retard répétées. L'importance du facteur durée a été bien mise en évidence, nous l'avons vu, à propos des interventions chirurgicales. Le calcul de la quantité totale/ 24 heures des 17-Hydroxycorticostéroïdes réellement sécrétée par les surrénales soumises soit à l'ACTH exogène, soit à un stress défini, n'a pas été fait sur une grande échelle. En effet, le taux des 17-Hydroxycorticostéroïdes plasmatiques étant la résultante de la sécrétion surrénale d'une part, de leur catabolisme tissulaire et de leur élimination urinaire d'autre part, l'inflation anormalement élevée de ceux-ci observée après chirurgie, brûlure, ou tout autre stress clinique, est peut-être le fait d'une diminution de leur consommation périphérique.

L'atteinte hépatique observée au cours des brûlures et de l'acte chirurgical en constitue peut-être déjà un indice. Une telle hypothèse toutefois n'explique pas que chez ces sujets l'ACTH exogène stimule normalement la cortico-surrénale. L'observation de paliers successifs dans la sécrétion surrénale rend ainsi difficile l'appréciation exacte de son potentiel sécrétoire.

Il est possible, encore que non démontré, qu'au cours de stress variés, la quantité d'ACTH circulante soit assez fixe, et que les variations de réponse surrénale soient uniquement liées à la durée du stimulus, qui entretient la sécrétion d'ACTH. Les dosages de l'ACTH plasmatique viendront peut-être dans un avenir proche résoudre ce problème. Mais d'ores et déjà, trois facteurs paraissent déterminants dans la stimulation surrénale :

concentration de l'ACTH, nature de celui-ci, et surtout durée d'action à concentration constante.

Reste également à étudier la composition qualitative de la sécrétion surrénale sous l'action de différents stress, problème qui n'a guère été abordé à ce jour.

E. - THYROÏDE

Sachant le rôle important de l'hormone thyroïdienne dans le métabolisme cellulaire, il était rationnel de penser que les dysthyroïdies (hyper ou hypothyroïdies) puissent retentir sur le fonctionnement surrénal.

Après administration d'hydrocortisone marquée, BROWN et Coll. (IV, 13), ont ainsi observé dans les hyperthyroïdoses : une accélération de la décroissance plasmatique des 17-Hydroxycorticostéroïdes libres, avec atteinte beaucoup plus rapide de l'équilibre entre l'hydrocortisone marquée et les 17-Hydroxycorticostéroïdes endogènes. / L'opposé, les conjugués montent plus vite et plus haut que chez des sujets normaux. PETERSON et Coll. (I, 60), ont également constaté l'augmentation du turn-over du fer, de la clearance plasmatique, et de la conjugaison de l'hydrocortisone dans l'hyperthyroïdie. Les modifications inverses s'observent au cours de l'hypothyroïdie. Mais de plus, la décroissance n'est pas une fonction exponentielle, ce qui suggère l'existence de plus d'un facteur limitatif, la glyco-conjugaison est normale, et enfin, la réduction de l'hydrocortisone est diminuée, contra chez le cirrhotique d'ailleurs.

Les modifications du débit hépatique ne rendent que partiellement compte des altérations du métabolisme des 17-Hydroxycorticostéroïdes mais des variations d'activité enzymatique hépatique, accrues chez les hyperthyroïdiens, interviennent vraisemblablement. BROWN et Coll. ont noté que la cortisone était plus rapidement métabolisée dans les coupes de foie d'animaux traités par la tri-iodothyronine que dans celles des animaux non traités (IV, 13). D'une manière plus générale d'ailleurs, le métabolisme de l'hydrocortisone suit assez fidèlement le rythme du métabolisme global de l'individu : plus rapide chez l'enfant que chez l'adulte, et chez l'adulte que chez le vieillard. TYLER et Coll., DOME et Coll.

Ces données sont importantes pour apprécier les résultats du test de THORN dans les maladies du corps thyroïde.

En effet, le taux des 17-Hydroxycorticostéroïdes libres est paradoxalement plus élevé chez les hypothyroïdiens que chez les hyper. Ce n'est là en fait, qu'une apparence : le rythme de décroissance des 17-Hydroxycorticostéroïdes étant très accéléré chez les hyperthyroïdiens, ces stéroïdes à peine sécrétés disparaissent rapidement du secteur vasculaire. Leur élimination rapide fait donc croire abusivement à une réponse surrénale insuffisante. L'inverse s'observe chez les hypothyroïdiens.

Ainsi la mesure des 17-Hydroxycorticostéroïdes libres chez les sujets dysthyroïdiens entraîne des erreurs par excès ou par défaut. La mesure des conjugués conduit à des erreurs assez voisines. S. MULLS a pu calculer que la sécrétion des 17-Hydroxycorticostéroïdes/kg/heure est plus élevée chez un malade hyper, qu'hypothyroïdien. Ainsi si l'on tient compte de la vitesse de disparition plasmatique, le fonctionnement thyroïdien et surrénal est modifié parallèlement.

Mais l'appréciation exacte de ce fonctionnement en cas de dysthyroïdie nécessite l'étude comparative du test de THORN, de la vitesse de disparition plasmatique des 17-Hydroxycorticostéroïdes et de leur élimination urinaire enfin.

Cette dernière aussi, prise isolément, peut induire en erreur : ainsi, au cours d'une hyperthyroïdie, l'élimination urinaire est parfois comparable à celle d'un syndrome de Cushing. Inversement, elle peut être très diminuée en cas de myxoedème, diminution essentiellement liée à celle de l'infiltration glomérulaire.

F. - DIVERS

I. - GROSSESSES.

- a) Grossesse normale : l'augmentation des corticoïdes urinaires, au cours du dernier trimestre de la grossesse surtout, J. YLE (IV, 42), DESGREZ et Coll. (IV, 19), est un fait connu de longue date, et qui fut très débattu. Les premiers travaux s'adressaient aux méthodes biolo-

giques (VENNING, IV, 79), TOBLIN (IV, 76), dont la précision et la spécificité étaient discutables si bien qu'aucune conclusion valable ne pouvait être tirée de ceux-ci. Il apparut d'ailleurs que les minéralo-corticoïdes surtout étaient augmentés, principalement dans les toxémies gravidiques.

GEMMELL (IV, 35), et ASSALI (IV, 1, 2), notamment ont repris cette étude sur le sang en utilisant la technique de Nelson et Samuel. GEMMELL rapporte :

- l'augmentation des 17-Hydroxycorticostéroïdes libres qui quadruplent dans le dernier trimestre de gravidité.
- leur accroissement à un niveau encore plus élevé au moment de la délivrance jusqu'à des valeurs comparables à celles observées lors du choc du stress chirurgical.
- enfin, leur effondrement après l'accouchement : des valeurs inférieures à la normale s'observent alors (20 g/100 ml, par exemple).

ASSALI trouve des chiffres compris entre 26,8 et 84 g/100 ml, soit en moyenne 49 g, chiffre qui s'élève à 59 - 111 (moyenne 80,9) au cours du deuxième stade du travail.

Cette augmentation des 17-Hydroxycorticostéroïdes libres est diversement interprétée :

GEMMELL l'attribue à la stimulation des surrénales tant chez la mère que chez le fœtus par l'inflation oestrogénique via l'hypothalamo-hypophyse, comme le fait a été noté chez l'animal (IV, 35). Le rôle exclusif des surrénales du fœtus lui paraît peu probable.

~~Mais~~ cette conception n'explique pas que le surrénal puisse se "surpasser" au cours du travail, ni

que le test de Thorn entraîne une réponse beaucoup plus forte chez la femme enceinte que chez la femme normale.

Aussi, ASSALI et Coll. invoquent-ils l'existence de sources extra-surrénales de stéroïdes : le placenta, entre les oestrogènes et la progestérone, sécréterait des substances type 11OTH ou cortisone. Ils attribuent aussi un rôle aux modifications du métabolisme de l'hydrocortisone, notamment de la consommation des tissus et de la clearance.

Dans un article récent, CHRISTY et Coll. (IV, 17) ont montré que la demi-vie de l'hydrocortisone était augmentée dans les derniers mois de la grossesse, de même que celle de la tétrahydrocortisone (75 minutes au lieu de 48) à la différence de ce qu'on observe dans les cirrhoses. Le glycuro-conjugaison semble donc diminuée. Dans les urines de femme enceinte, les 17-Hydroxycorticostéroïdes libres sont proportionnellement plus importants que dans celles des femmes normales. Quant aux conjugués, ils ne sont que modérément diminués (MIGEON et Coll., IV, 53). La présence de chromogènes persiste après hydrolyse enzymatique des urines expliquant que leur taux soit souvent trouvé normal.

Deux problèmes se posent :

- l'augmentation de la demi-vie de l'hydrocortisone et de la tétrahydrocortisone explique-t-elle à elle seule l'augmentation des 17-Hydroxycorticostéroïdes observée en fin de grossesse ? Il ne le semble pas, sinon ces stéroïdes devraient être également augmentés dans les cirrhoses, ce qui n'est pas le cas.

- une liaison stéroïde globuline plus forte existerait-elle, s'opposant au départ des stéroïdes ? SLUNWHITE et SHENBERG (I, 76), viennent de décrire une

γ-globuline vraisemblablement analogue à celle de DEUGHADAY qui serait liée spécifiquement à l'hydrocortisone et à la corticostérone. Par analogie avec la transferrine, ils l'ont nommée la transcortine. Or, cette protéine serait augmentée dans le dernier trimestre de la grossesse. Il reste à prouver que sa très haute affinité pour l'hydrocortisone et son augmentation en fin de grossesse sont responsables de l'augmentation de la demi-vie de l'hydrocortisone. La liaison à cette transcortine inactiverait le stéroïde : ainsi s'expliqueraient peut-être l'absence de signes d'hypercorticisme dans la grossesse malgré l'augmentation importante et durable des 17-Hydroxycorticostéroïdes libres.

- Il est probable que l'hyperfonctionnement hypothalamo-hypophysaire global et de l'axe surrénal notamment, ne soit plus physiologiquement freiné par le taux des hormones surrénales circulantes. De ce fait, l'augmentation des 17-Hydroxycorticostéroïdes existe en permanence. La liaison hydrocortisone-transcortine camoufle peut-être l'hydrocortisone et inhibe ainsi son pouvoir régulateur vis-à-vis de la sécrétion d'ACTH.

Quant à l'augmentation parallèle de la demi-vie de la tétrahydrocortisone (qui est normale à l'opposé dans les cirrhoses), elle traduit vraisemblablement une diminution de la glycuco-conjugaison hépatique et non une altération du temps préalable nécessaire de réduction. Ce trouble s'apparenterait à celui observé dans les syndrômes congénitaux avec déficit de la glycuco-conjugaison dont le syndrome de CRIGLER-NAJJAR est le type. La aggravation de ce trouble, en

quelque sorte physiologique au cours de la gravidité, serait peut-être responsable des ictères récidivants de la grossesse dont l'évolution est si étroitement liée à celle de la gravidité. MIGEON et Coll. (IV,53), COHEN et Coll. expliquent l'inflation des 17-^{OH}-corticostéroïdes plasmatiques au cours de la grossesse par deux mécanismes :

- d'une part, la diminution de la transformation de l'hydrocortisone en tétra F et tétra E, en rapport avec l'augmentation des oestrogènes,
- d'autre part, une modification de la distribution de l'hydrocortisone dans l'organisme, cette hormone étant retenue essentiellement dans le secteur intra-vasculaire. Cette distribution particulière expliciterait l'absence d'hypercorticisme clinique.

b) Grossesse et Addison.

Quelques rares cas de grossesse au cours de maladie d'Addison authentique ont été rapportés. Dans une observation de ce genre, BAULIEU et Coll. (IV,6) n'ont pas trouvé de 17-hydroxycorticostéroïdes dans le plasma de leur malade.

c) Toxémie gravidique.

Beaucoup de travaux ont été consacrés aux toxémies gravidiques pour savoir s'il existait dans ces cas une augmentation élective des 17-hydroxycorticostéroïdes libres. ASSALI et Coll. (IV,12) ont toujours noté des taux normaux de libres. Mais de nouvelles recherches s'imposent, à la lumière notamment de nos dernières connaissances sur le rôle physiopathologique dans la grossesse des protéines liées à l'hydrocortisone et à la cortisone.

II - ENFANTS

Le taux des 17-hydroxycorticostéroïdes ne subit pas, comme celui des 17-cétos des variations importantes en fonction de l'âge, de la puberté notamment. Dès la deuxième semaine de la vie environ, le taux des 17-hydroxycorticostéroïdes libres est comparable à celui de l'adulte. Le fléchissement de la corticoïdémie observé dans les 3 premiers jours qui suivent la naissance (KLEIN IV,47) serait contemporain pour GARDNER de la transformation du tissu surrénalien fœtal en tissu de type adulte. Si le taux des 17-OH-stéroïdes devient vite comparable à/.....

celui de l'adulte, la réponse de la corticosurrénale de l'enfant à l'A.C.T.H est par contre plus forte que celle de l'adulte.

Enfin, BONGIOVANNI et coll. (1958) ont montré que la demi-vie de l'hydrocortisone était franchement augmentée dans les premiers jours après la naissance . Il existerait ainsi une certaine similitude entre la demi-vie de l'hydrocortisone chez la mère avant le terme, et chez son nouveau-né. Ces auteurs ne pensent pas contrairement à GRODSKY que l'élévation de la demi-vie soit liée indirectement au déficit en acide glycuronique transferase, étant donné que la tétrahydrocortisone injectée disparaît dans des délais normaux. Se référant aux travaux de WALLACE, qui ont montré que l'administration d'oestrogènes chez l'homme retarde la disparition de l'hydrocortisone, BONGIOVANNI et coll. se demandent si les oestrogènes maternel . transmis au fœtus ne sont pas responsables de l'augmentation de la demi-vie de l'hydrocortisone chez ce dernier. La constatation par DICZFALUSY et coll. de la diminution rapide des oestrogènes dans les urines des nouveaux-nés (qui atteindrait un taux négligeable vers le 5e jour,) constituerait peut-être un argument en faveur de l'hypothèse de BONGIOVANNI.

III - AFFECTIONS DIVERSES

Au cours du stress émotionnel (EULER, IV, 31), de l'anorexie mentale, (BLISS, MIGEON, IV, 8), aucune augmentation des 17-hydroxycorticostéroïdes n'a été notée . Par contre, chez les anxieux (PERSKY, IV, 59), il existerait une augmentation de la clearance plasmatique de l'hydrocortisone, contrastant avec la diminution d'environ de moitié de l'élimination urinaire de ce stéroïde.

L'histamine, comme l'adrénaline n'aurait aucune action sur la sécrétion des 17-hydroxycorticostéroïdes.

L'action de type cortisonique de l'aspirine serait explicitée pour DONE et Coll. par la franche augmentation des 17-hydroxycorticostéroïdes observée après administration de fortes doses de dérivés salicylés. Aux doses de 3 à 5 g./jour, per os, BAYLISS et Coll. (IV, 3) n'ont pas observé d'augmentation des stéroïdes chez l'adulte.

CONCLUSIONS

A. - LA METHODE DE DOSAGE que nous proposons est dérivée de celle de SILBER et BUSCH (II, 59) pour les 17-Hydroxycorticostéroïdes libres, de celle de BONGIOVANNI et EBERLEIN (I, 11a) pour les conjugués.

I. - Elle diffère essentiellement de la première technique :

- par une simplification des temps de purification et d'extraction : absence de lavage par un solvant non polaire, deux extractions au lieu de trois,
- par l'emploi d'une quantité plus petite de réactif de PORTER-SILBER (0,5 ml) qui confère plus de sensibilité à la réaction colorée, et permet du même coup l'emploi éventuel d'échantillons plasmatiques plus petits (5 ml. par exemple).
- par l'utilisation de dichlorométhane "technique" qui peut être parfaitement purifié par une méthode simple et rapide. Le dichlorométhane ainsi purifié peut se conserver deux mois en glacière sans s'altérer.

Le reproductibilité de la méthode est comparable à celle des autres techniques avec ou sans adsorption sur colonne.

Les pourcentages de récupération de l'hydrocortisone ajoutée au plasma sont identiques à ceux indiqués par d'autres auteurs : 90 % en moyenne avec comme limites 65 à 109 %.

Le sensibilité aux taux de 5 µg est de + 0,6 µg.

Des extraits dichlorométhaniques de différents plasmas ont été chromatographiés sur papier (Système BUSH C). Les chromatogrammes ont montré la présence d'hydrocortisone et de cortisone authentiques (identifiés par le B.T. et en UV) dont la quantité globale équivalait à celle mesurée par notre méthode. Cette identité de résultat prouve d'une part la validité de l'extraction et de la réaction de PORTER-SILBER, et d'autre part, l'absence de chromogènes parasites malgré la simplification des moyens de purification.

II. - La méthode de dosage des 17-Hydroxycorticostéroïdes conjugués diffère de celle de BONGIOVANNI et EBERLEIN par :

- l'absence d'adsorption sur colonne, la purification du milieu étant assurée par un partage benzène-eau et ensuite un lavage au dichlorométhane avant l'hydrolyse enzymatique.

- par l'emploi de β -glycuronidase, désuée "d'hélix portia", non génératrice de chromogènes parasites, de préparation assez longue certes, mais d'un prix de revient modéré. Les doses employées sont actuellement de 300 u/ml de substrat à hydrolyser, mais avec l'emploi de la cystéine, elles paraissent pouvoir être réduites.

Du fait d'un nombre encore trop petit de dosages, et de l'absence de glycuronide d'hydrocortisone de synthèse, nous n'avons pas pu évaluer avec précision les différentes caractéristiques de cette méthode : sensibilité, reproductibilité, pourcentages de récupération.

III. - Par rapport aux autres méthodes purement chimiques, SILBER-PORTER, SILBER-BUSCH, REDDY, CIERESA et CRAVETTO, la méthode présentée ici est plus simple, d'exécution rapide et facile, donc tout à fait adaptée aux besoins de la routine clinique.

Le dosage en simple des corticostéroïdes libres de trois échantillons plastiques différents, peut être tendu de bout en bout par une personne un peu entraînée en un après-midi. Celui des conjugués est plus long du fait du temps de défécation initiale avec évaporation de l'éthanol, du partage benzène-eau et de l'hydrolyse enzymatique ensuite. Si l'on ne tient pas compte de l'hydrolyse (on fait "chevaucher" plusieurs dosages successifs), il faut à peine une journée entière pour 4 dosages de conjugués.

Les techniques physico-chimiques, celles qui comprennent notamment un temps de purification par adsorption sur colonne, ne donnent pas de garantie notablement supérieure. (si l'on ne prend soin de mener en parallèle un témoin réactif, de comparer témoin et dosage plastique, et de faire la correction d'Allen), pour une dépense de temps et de matériel beaucoup plus grande. D'une variabilité plus délicate, leur sécurité est inconstante, étant donné la variabilité observée d'un lot à l'autre, malgré une purification rigoureuse, dans le pouvoir adsorbant du florisil, ou du silicate de magnésium-Celite. Ces techniques sont plus spécialement recommandées pour les travaux de recherche et notamment comme temps préparatoire à l'analyse qualitative, et à la séparation précise des stéroïdes.

IV. - Comme toute micro-analyse, la présente méthode nécessite cependant beaucoup de soin, de minutie même, dans la purification des réactifs et dans le lavage de la verrerie. Les réactifs doivent être purifiés périodiquement, certains même extemporanément, leur durée de conservation étant limitée pour la plupart d'entre eux. Le lavage de la verrerie est aussi capital : lavage au mélange sulfo-chromique (de préparation récente), puis à l'eau courante, au moins une dizaine de fois, enfin à l'eau distillée, et dans le solvant ou le réactif correspondant avant l'emploi. Ces deux conditions, pureté des réactifs, propreté de la verrerie, sont absolument indispensables : il n'est pas de dosage possible si elles ne sont pas satisfaites.

V. - Nous n'avons pas encore adapté de micro-réaction de ZILM-MERMAN et de B.T. à la technique décrite ici comme l'ont fait déjà CERESA et CRIVETTO (II, 7). Ces micro-réactions misés au point permettraient de doser sur

le même échantillon plasmatique, les 17-cétostéroïdes libres et conjugués et les 17-désoxycorticostéroïdes, (ces derniers par différence avec les 17-Hydroxycorticostéroïdes).

VI. - Résultats :

Chez les sujets normaux, les chiffres moyens de 17-Hydroxycorticostéroïdes libres observés entre 7 heures et 9 heures sont de $12,1 \pm 3,6$ $\mu\text{g}/100$ ml. (2 σ soit 95 % de limites de confiance).

Les chiffres moyens des conjugués sont dans les mêmes conditions de $8,4$ $\mu\text{g}/100$ ml.

Nos résultats sont en parfait accord avec ceux obtenus par d'autres techniques dont les principales ont été colligées dans le tableau n° 4.)

Après ACTH intraveineuse (25 u/8h.), quel que soit le taux de base, les corticoïdes libres atteignent en fin de perfusion 43 $\mu\text{g}/\text{ml}$. en moyenne. Les conjugués s'élèvent moins haut, vers 20 $\mu\text{g}/100$ ml.

Plus encore que le pourcentage d'augmentation de l'hydrocortisone par rapport à son niveau de départ, ou que la différence de valeur entre son taux avant et après ACTH, c'est la valeur absolue de son pic, qui nous paraît peut-être exprimer le mieux la réponse surrénale. Cette interprétation s'oppose à celle des dosages urinaires : il ne faut pas oublier que l'élimination urinaire de 24 heures représente une somme, alors que l'on ne dose dans le plasma qu'un instantané.

VII. - Ainsi, avec cette méthode adaptée à la routine clinique, le dosage des 17-Hydroxycorticostéroïdes libres et conjugués du sang est ainsi techniquement presque aussi facile que celui des urines. Comme nous le verrons plus loin, le dosage des stéroïdes plasmatiques fournit dans la plupart des maladies, endocriniennes ou non, les mêmes renseignements que celui des urines.

On lui a reproché de ne mesurer qu'un "instantané" plasmatique, alors que le dosage urinaire mesure une somme. L'appréciation de l'instantané plasmatique reste tout aussi valable que celle de l'élimination globale des 24 heures dans les urines si l'on effectue le dosage dans des conditions

toujours identiques et notamment à une heure donnée du nycthémère. On évite ainsi les fluctuations dues au cycle journalier de ces stéroïdes.

Le dosage plasmatique présente, à de multiples avantages. Il mesure d'une part les hormones natives, et non leurs métabolites quasi-exclusifs comme c'est le cas dans les urines. Il permet d'autre part d'apprécier leur vitesse de disparition plasmatique, et leur turn-over, permettant ainsi d'approcher beaucoup mieux que ne le fait le dosage urinaire leur métabolisme intermédiaire. On a vu combien les études des 17-Hydroxycorticostéroïdes libres et conjugués après perfusion d'hydrocortisone, de tétra-hydrocortisone, de tétrahydrohydrocortisone s'étaient révélées riches d'enseignement à ce sujet. Le dosage urinaire est forcément beaucoup plus limité dans ses objectifs, puisqu'il n'apprécie que le stade ultime du métabolisme hormonal, après franchissement de la barrière rénale.

B. - L'étude du métabolisme intermédiaire de l'hydrocortisone n'en est qu'à ses débuts. Grâce aux dosages plasmatiques après surcharge en hydrocortisone, en tétrahydrocortisone, ou en tétrahydro-hydrocortisone, et maintenant aux techniques isotopiques, le devenir de ses hormones a été bien précisé.

I. - La fraction "circulante" de l'hydrocortisone n'est connue que depuis peu de temps. Les stéroïdes n'échappent pas à la règle générale selon laquelle la plupart des composés "solubles" du sérum sont liés aux protéines. Pour l'hydrocortisone, cette liaison se ferait à un double palier :

- Au palier le plus bas, c'est-à-dire aux concentrations physiologiques, l'hydrocortisone serait liée en totalité à une -globuline spécifique appelée "transcortine" par SLIMMITE et Coll. (I, 76), comparable à la œruloéplasmine et à la transferrine par exemple.
- Au palier supérieur, l'albumine lierait, mais de façon beaucoup plus lâche, les 17-Hydroxycorticostéroïdes en excès.

La signification de cette liaison stéroïde-protéine est dis-

cutée : elle joue vraisemblablement un rôle de transport, mais elle inactive peut-être aussi le stéroïde en le transportant, ainsi, un déficit en cette transcutine pourrait être théoriquement responsable d'un hypercorticisme avec taux normal des 17-21-dihydroxycorticostéroïdes.

II. - Dans le métabolisme de l'hydrocortisone, le double rôle du foie, réduction, temps préalable à la glycuro-conjugaison, est maintenant assez bien déterminé. Les systèmes enzymatiques qui commandent chacun de ces temps ont été définis. La connaissance de leur déficit acquis (système réducteur pour les cirrhoses, glycuro-conjugaison dans la grossesse), ou congénitux (glycuro-conjugaison dans la maladie de Gilbert, le syndrome de Crigler-Najjar) a permis d'élucider la physiopathologie de troubles jusqu'alors inexpliqués, débordant largement le cadre du métabolisme hormonal. Il n'est pas impossible en effet, que certains ictères d'allure rétionnelle, tels les ictères thérapeutiques à la Chlorpromazine, à la Méthyltestostérone, aux anti-thyroïdiens de synthèse, et même les si curieux ictères récidivants de la grossesse, ne relèvent pas également d'un déficit momentané en certains systèmes enzymatiques du foie.

III. - Le rôle du rein est en apparence moins complexe. Cependant, il semble qu'à côté de la filtration glomérulaire, très différente pour les 17-Hydroxycorticostéroïdes libres ou conjugués, la cellule tubulaire intervienne, mais cette fois dans la glycuro-conjugaison.

C. - Applications cliniques.

Les 17-Hydroxycorticostéroïdes plasmatiques ont été étudiés dans différentes maladies, endocrinienne ou non.

I. - SURREN. LE.

Elle est explorée par le dosage des 17-Hydroxycorticostéroïdes libres et conjugués dans les conditions basales et sous l'ACTH.

a) Après administration de 25 unités/8heures d'ACTH par voie intraveineuse, nous avons observé une ascension des corticoïdes libres culminant à 43 µg par 100 ml en moyenne à la fin de la perfusion. Les conjugués s'élèvent nettement moins, atteignant en moyenne 20 µg, quel que soit le taux

de base. Contrairement aux dosages urinaires, où l'on apprécie, en vue de tester la réponse surrénale, l'augmentation en pourcentage ou en quantité absolue des stéroïdes après stimulation, par rapport au niveau de départ, pour les dosages plasmatiques, c'est la valeur absolue du pic des stéroïdes qui nous paraît la plus représentative de cette réponse.

Bien que le dosage plasmatique ne permette pas de chiffrer la sécrétion globale/24 h. de la surrénale, (comme le fait le dosage urinaire) les renseignements qu'il fournit avant et après stimulation par l'ACTH sont aussi valables.

Les stéroïdes plasmatiques ont été étudiés dans les différentes formes de dysfonctionnement de la corticosurrénale:

b) Les hypercorticismes.

Dans l'ensemble, les 17-Hydroxycorticostéroïdes libres sont notablement augmentés, au-delà des limites considérées comme normales. Si significative que paraisse cette élévation de la sécrétion de base, elle prend encore plus de relief après ACTH. En effet, qu'il s'agisse d'hyperplasie bilatérale, d'adénome, ou de carcinome, les taux de base des 17-Hydroxycorticostéroïdes peuvent être sensiblement voisins. A l'opposé, l'épreuve à l'ACTH fait apparaître souvent de notables différences. Ainsi d'une manière très schématisée d'ailleurs, les hyperplasies s'objectivent alors par une élévation très importante des corticoïdes libres alors que le carcinome très souvent "ne répond pas" à l'ACTH. Entre ces deux extrêmes se situent les adénomes dont la réponse est souvent faible et dissociée (les 17-Hydroxycorticostéroïdes et les 17-cétostéroïdes ne s'élèvent pas parallèlement). Certes, cette triple distinction n'a pas de valeur formelle, mais elle permet souvent de suspecter le type anatomique de la lésion surrénale. Cette distinction, on le conçoit aisément, n'est pas exempte d'intérêt thérapeutique et pronostique.

Bien plus, l'épreuve à l'ACTH s'avère indispensable pour permettre le diagnostic même d'hypercorticisme. En effet, et ce n'est pas une éventualité très rare, le taux de base des 17-Hydroxycorticostéroïdes libres peut être normal. L'ACTH lève en règle les doutes, en montrant une réponse surrénale anormalement importante. Ces formes d'hypercorticisme avec sécrétion

normale de l'hydrocortisone s'expliquent peut-être comme l'ont proposé SL: UN HITE et Coll. (1, 76), par l'absence de "camouflage" des stéroïdes par la "transcortine". En effet, cette γ -globuline lie spécifiquement à elle l'hydrocortisone : si la globuline vient à diminuer, une partie de l'hydrocortisone se trouve à l'état libre dans le plasma, gardant ainsi tout son pouvoir biologique vis-à-vis des récepteurs, alors que normalement, son activité est masquée par sa liaison avec l' γ -globuline.

c) Hyperplasie surrénale congénitale.

Tous les auteurs sont d'accord pour reconnaître la diminution franche ou parfois seulement à la limite inférieure de la normale des 17-Hydroxycorticostéroïdes. Ceux-ci ne se relèvent que peu, après ACTH, puisqu'il existe un blocage enzymatique intervenant au niveau de leurs précurseurs.

d) Addison.

Les remarques précédentes s'appliquent à l'Addison. En effet, en dehors des cas où l'effondrement des 17-Hydroxycorticostéroïdes est franc, leur diminution est parfois modérée voire nulle. Ceci est la règle lorsque le cortex surrénalien n'est pas détruit en totalité. Là encore, l'épreuve à l'ACTH est indispensable : l'absence de réponse après une telle épreuve objective l'insuffisance surrénale primitive.

A l'opposé, il y a des insuffisances surrénales secondaires, liées soit à un déficit hypophysaire, soit à une affection chronique ayant retenti gravement sur l'état général, et notamment la nutrition. Dans de tels cas, les taux de base des 17-Hydroxycorticostéroïdes sont bas, mais ils se relèvent franchement le plus souvent après une deuxième, voire une troisième épreuve à l'ACTH. Tout paraît se passer comme si le surrénal était en "sommeil" depuis longtemps, et qu'il faille plusieurs stimulations par l'ACTH pour le réveiller.

II. - LE STRESS.

Les différentes formes de stress, traumatique, chirurgical, médical, ont été étudiées sous l'angle des 17-Hydroxycorticostéroïdes plasmatiques. D'une manière générale, et nous l'avons nous-même observé à maintes reprises, le stress, quel que soit son type, stimule beaucoup plus violemment le surrénal que ne le fait l'ACTH exogène. En effet, des taux très élevés, supérieurs à 50, 60 g

par 100 ml, de 17-Hydroxycorticostéroïdes libres ont été observés dans des circonstances aussi diverses qu'un oedème pulmonaire, une crise d'asthme, un traumatisme osseux, une intervention chirurgicale, une brûlure étendue, ou une maladie infectieuse sévère. Des taux de l'ordre de 100 à 200 g par 100 ml ont été rapportés. Cette différence évidente dans la réponse surrénale en fonction de la nature de l'agent stimulant repose le problème de la pluralité des ACTH. Indépendamment du fait que l'ACTH endogène libéré sous l'action du stress a peut-être un pouvoir biologique quantitativement supérieur ou qualitativement différent de l'ACTH exogène, la durée de la stimulation semble être un des éléments essentiels dans l'établissement de la réponse surrénale.

III. - AUTRES AFFECTIONS :

Nous ne revenons pas sur l'intérêt des dosages des stéroïdes plasmatiques dans les affections rénales, hépatiques, ou thyroïdiennes. Nous avons noté une augmentation des 17-Hydroxycorticostéroïdes dans deux cas de diabète hydratifurc vus au début du 6ème mois. Fait curieux, cette élévation s'est révélée parallèle à celle des prolins urinaires, disparaissant comme celle-ci après l'avortement médical. Nous voulons encore insister sur l'augmentation des corticoïdes dans le dernier trimestre de la grossesse, augmentation parallèle, semble-t-il, à celle de la "transcortine".

Mais il reste un champ d'investigation pratiquement inexploité encore : celui du devenir métabolique de l'hydrocortisone au niveau du récepteur tissulaire. On ne sait pratiquement rien de l'espece de diffusion de l'hydrocortisone et de ses métabolites, de son passage dans la cellule, du mécanisme intime de son action à l'échelon cellulaire, sur les mucopolysaccharides notamment. Son pouvoir anti-inflammatoire si remarquable qui semble s'exercer électivement sur les altérations de la substance fondamentale n'a pas encore été bien expliqué. La découverte chaque jour de nouveaux stéroïdes de synthèse dont l'action anti-inflammatoire se trouve amplifiée par la fixation d'un radical en un point variable de leur molécule, ouvre assez le chemin qui reste à parcourir pour élucider les réactions moléculaires induites par l'hydrocortisone au sein même de la cellule.

Vu le Président de Thèse

Vu le Doyen

signé : Professeur M.F. JAYLE

signé : L. BINET

Vu et permis d'imprimer
Le Recteur de l'Université de Paris
signé : Jean SARRAILH

ADDITIF

METHODES DE PURIFICATION DES DIFFERENTS REACTIFS.

I - DICHLOROMETHANE -

- a) Dans une grande ampoule à décantation, laver le dichlorométhane (Rhône Poulenc Technique) avec SO_4H_2 concentré (environ 1/20 du volume du dichlorométhane). Agiter à plusieurs reprises. Renouveler l'acide sulfurique jusqu'à ce qu'il devienne presque incolore. Rejeter l'acide.
- b) Laver ensuite deux fois avec de l'eau ordinaire puis distiller (1/10 de volume environ).
- c) Ajouter alors 1 à 2 g. d'héxaméthylène-tétramine. Agiter, laisser en contact 5 à 10 minutes. Laver à nouveau à l'eau distillée jusqu'à ce que le dichlorométhane devienne limpide. 4 à 5 lavages, parfois plus, sont nécessaires.
- d) Ajouter quelques grammes de soude anhydre. Filtrer sur coton de verre. Distiller.
- e) Garder le coeur de distillation dans des flacons en verre teinté et à la glacière de préférence.
Le dichlorométhane ainsi purifié reste stable au moins 2 mois.
(cf. tableau N° 12).

II - BENZENE -

- a) Dans une grande ampoule à décantation laver 2 fois le benzène Rhône Poulenc (pour analyses) avec SO_4H_2 concentré (1/10 de volume chaque fois). Agiter. Rejeter l'acide.
- b) Laver ensuite à l'eau ordinaire puis distiller (une fois), et à la lessive de soude (1/10 de volume environ). Laver enfin à l'eau 4 fois.
- c) Laisser reposer une nuit sur Cl_2Ca , filtrer. Laisser une nuit

sur sodium.

- d) Distiller et garder le coeur de distillation en bouteilles de verre teinté de préférence.

Le benzène ainsi purifié ne donne aucune coloration parasite en présence de réactif de PORTER-SILBER, après 24 heures à la température du laboratoire. Il peut se conserver aisément 3 mois sans s'altérer.

III - β -Glycuronidase d'"HELIX POMATIA".

- a) La méthode de purification est empruntée à celle décrite par Madame ALFSEN dans sa thèse (V, 1). Le principe en est le suivant :

la β -glycuronidase est précipitée par le sulfate d'ammonium. Le précipité est repris par un tampon acéto-acétique, puis dialysé. Une adsorption sur gel de phosphate tricalcique permet d'éliminer la majeure ^{partie} des pigments et de la sulfatase restante.

La sulfatase précipite à 60 % de la saturation en $(\text{SO}_4\text{NH}_4)^2$

- b) Ensuite on procède aux précipitations alcooliques :

- 1ère précipitation à 17 %
- 2ème " à 26 % à basse température
- 3ème " à 56 % à -20° .

Le précipité obtenu après la dernière précipitation est dissout dans du tampon citrate 0,1 M - pH : 5,5.

- c) On dialyse une dernière fois contre de l'eau distillée à 0° pour enlever l'alcool restant.

IV - AUTRES REACTIFS -

Nous renvoyons le lecteur aux descriptions publiées par :

- a) REDDY et Coll. (II, 52), BROWN et Coll. (IV, 14) pour le butanol.
- b) PETERSON et Coll. (II, 48), HARWOOD et MASON (II, 22) pour l'éthanol.

c) NELSON et SAMUELS (2I, 43), HARWOOD et MASON (II, 22) pour le florisil et le chlorhydrate de phényl-hydrazine.

V - REMARQUE -

Le chloroforme peut être purifié avec la même technique que celle proposée pour le dichlorométhane. Il est toutefois recommandé de distiller sur CO_3K_2 immédiatement avant l'emploi la quantité de chloroforme nécessaire au dosage.

CHAPITRE I

- 1 - ABELSON D., BORCHERDS D.A.,
Plasma cortisol levels in man following oral and intra-
venous administration of cortisol.
- J.C.E.M. 1959, v19, 2, pp 219-24.
- 2 - AYRES P.J., GARROD O., TAIT S.A.S., TATE J.F., WALKER G.,
PEARLMAN W.H.
The use of 16-³H aldosterone in studies on human peri-
pheral blood .
- Ciba foundation "Hormones in blood" 1957, v11, pp309-30.
- 3 - BAGGETT B., GLICK J.H., KINSELLA R.A. Jr.,
Urinary excretion of tetrahydrocortisone .
- J.Clin. Inv. 1952, v 31, pp 615.
- 4- BAULIEU E.E.,
Isolément dans le plasma et dans l'urine d'ester-sulfate
de 5-androstène 301-17 ONE chez une malade atteinte de
tumeur surrénalienne.
- Communication personnelle.
- 5 - BLISS E.L., SANDBERG A.A., NELSON D.H., et EIK-NES K.,
The normal levels of 17-hydroxycorticosteroids in the
peripheral blood of man .
- J.Clin.Inv. 1953, v32, pp 818-23
- 6 - BONDY P.K., UPTON G.V.,
Simultaneous determination of cortisol and corticostero-
ne in human plasma by quantitative paper chromatography.
- Proc.soc.exp.biol. 1957, v94, 3, pp 585-89.
- 7 - BONDY P.K., ALTROCK J.R.,
Estimation of the rate of release of adrenal 17-hydroxy-
corticosteroids in the human being by the venous cathe-
ter technique with a method for determining plasma
17-hydroxycorticosteroids.
- J.Clin.Inv. 1953, v32, pp 703-10.
- 8 - BONGIOVANNI A.M., EBERLEIN W.R.,
Renal clearance of neutral 17-cetosteroids in man.
- J.C.E.M. 1957, v17, 2, pp 238.
- 9 - BONGIOVANNI A.M., EBERLEIN W.R., GRUMBACH M.H., VAN WYCK J.J.,
CLAYTON G.,
Conjugates of adrenal corticoids in human plasma.
- Proc.soc.ex biol.med. 1954, v87, pp 282-87.
- 10- BONGIOVANNI A.M.,
Detection of corticoids conjugates in human blood.
- J.C.E.M. 1954, v14, 3, pp341-44

- 11- BONGIOVANNI A.M., EBERLEIN W.R.,
 - a) The determination, recovery, identification and renal clearance of conjugated adrenal corticoids in human peripheral blood.
- Proc.of the soc.for exp.biol. and med. 1955, v89, pp 281-85.
 - b) Adrenocortical steroids in the peripheral blood of man.
- J.C.E.M. 1955, v15,12, pp 1524-30.
- 12- BROWN H.,ENGLERT E.Jr.,WALLACH S.,SIMONS E.L.,
Metabolism of free and conjugated 17-hydroxycortico-steroids in normal subject.
- J.C.E.M. 1957, v17, 10, pp 1191-1201.
- 13- BROWN H.,ENGLERT E.Jr.
Metabolism of the conjugated 17-hydroxycorticoids.
- J.Clin.Inv. 1955, v34, pp 924.
- 14- BURSTEIN S.,SAVARD K., DORFMAN R.I.,
The in-vivo metabolism of cortisone.
- Endo. 1953, T 52,4, pp 448-52 .
- 15- BUSH I.E.,
The physico-chemical state of cortisol in blood.
- Ciba foundation "hormones in blood" 1957,T11,pp263-85.
- 16- BUSH I.E.,
Species differences and other factors influencing adrenocortical secretion.
-Ciba foundation "synthesis et metabolism of adreno-cortical steroids" 1953, T 7,pp 210-32.
- 17- BUSH I.E.,
 - a) Methods of paper chromatography of steroids applicable to the study of steroids in mammalian blood and tissues.
- Biochemical J. 1951 , T 50,pp 370.
 - b) Discussion in Recent progress in hormon research.
- Pincus G. Ed. New-York Ac. Press 1954,v9,pp 356.
- 18- BUSH I.E.,SANDBERG A.A.,
Adrenocortical hormones in human plasma.
J.Biol. Chem. 1953, v 205, 2, pp 783-93.
- 19- BUSH I.E.,
The physical chemical state of cortisol in blood.
- Ciba foundation "hormones in blood"1957,T11,pp263-85
- 20- COHN G.L.,BONDY P.K.,
The isolation, characterization and measurement of steroids glucuronides in human plasma.
- J.Biol.Chem. 1959, T234, 1, pp 32-35.

- 21- DAUGHADAY W.H.,
Binding of corticosteroids by plasma proteins. I- Dialysis equilibrium and renal clearance studies.
- J.Clin. Inv. 1956, T 35, 12, pp 1428-34.
- 22- Id.
Binding..... II- Paper electrophoresis and equilibrium paper electrophoresis.
- J.Clin.Inv. 1956, T 35, 12, pp 1435-39.
- 23- Id.
Binding III- The binding of corticosteroid and related hormones by human plasma and plasma protein fractions as measured by equilibrium dialysis.
- J.Clin.Inv. 1958 , T 37, 4, pp 511-19.
- 24- Id.
Binding..... IV- The electrophoretic demonstration of corticosteroid binding globulin.
J.Clin.Inv. 1958,T 37, 4, pp 519-23.
- 25- Id.
Binding V- Corticosteroid binding globulin activity in normal human being and in certain disease states.
- Arc.int.med. 1958, T 10,1, pp 256.
- 26- DAUGHADAY W.H.,
Corticosteroid binding by plasma α -globulin (abstract).
- J.Clin.Inv. 1957, T 36, pp 681.
- 27- DAUGHADAY W.H.,
Evidence for two corticosteroid binding systems in human plasma (abstract).
- J.Lab.Clin.Med. 1956, T 48, pp 799.
- 28- DEVIS R.,
a) Les liaisons entre stéroïdes et protéines dans l'organisme animal.
- Bull. Soc.Chim.biol. 1955, T 37, 5-6, pp 563-87.
b) La chimie des stéroïdes cortico-surrénaux . Rapport au XXVIII e congrès français de médecine.
- Acta Clinica Belgica 1951.
- 29- DOE R.P., FLINK E.B., FLINT M.G.,
Correlation of diurnal variation in eosinophils and 17-hydroxycorticosteroids in plasma and urine. (abstract)
- J.C.E.M. 1954, T 14, 7,26, pp 774-75.
- 30- DUTTON G.D., STOREY I.D.E.,
Uridine compounds in glucuronic acid metabolism.I The formation of glucuronides in liver suspensions.
- Bioch. J. 1954,v57, pp 275-83

- 31- EADES C.H. Jr, POLLACK R.L., KING J.S. Jr,
An aminoacid steroid conjugate excreted in urine.
- Fed.Proc. 1954, v 13, 672, pp 201.
- 32- EIK-NES , SHELLMAN J.A., LUMRY R., SAMUELS L.T.,
The binding of steroids to protein. I- Solubility
determination.
- The J.of Biol.Chem. 1954, T 206, 1, pp 411-19.
- 33- ENGEL E., HELMREICH M.L., HERTOEGHE J., BORTH R.
Variations du taux plasmatique des 17-hydroxycortico-
stéroïdes au cours du nycthémère et apres administration
d'A.C.T.H. -Sem.Hôp. 1955, v31, 2, pp 70-78.
- 34- ENGEL, E., HELMREICH M.L., HERTOEGHE J., FABRE J., MULLER AF., MACH RS.,
Variations du taux plasmatique des 17-hydroxycortico-
stéroïdes dans l'agression aigue en clinique.
Sem. Hôp . 1955, v31, 2, pp78-86.
- 35- FUKUSHIMA D.K., LEEDS N.S., BRADLOW H.L., KRITCHEVSKY T.H.,
STOKEM M.B., GALLAGHER T.F.,
The characterization of four new metabolites of adre-
no-cortical hormones.
- J.Biol.Chem. 1955, v 213, pp 449.
- 36- GALLAGHER T.F.,
Studies of the metabolite of isotopic steroid hormo-
nes in man.
- Recent progress in hormon research 1954, v9, pp 411.
- 37- HECHTER O.,
Corticosteroid metabolism in isolated perfused rat
livers.
-Ciba foundation "synthesis and metabolism of adreno-
cortical steroids" 1953 ,v7, pp 272-90.
- 38- HELLMAN L., BRADLAW H.L., ADESMAN J., FUKUSHIMA D.K., KULP J.L.,
GALLAGHER T.F.,
The fate of hydrocortisone 4-C¹⁴ in man.
-J.Clin.Inv. 1954, v 33, 8, pp 1106-16.
- 39- HETZEL B.S., SCHOTTSTAEDT W.W., GRACE W.J., WOLFF H.G.,
Changes in 17-hydroxycorticosteroids expression during
stressfull life experience in man.
- J.C.E.M., 1955, v 15, 9, pp 1057-69.
- 40- HOLNESS N.J.,
Protein binding in vivo of free and conjugated 14-C
labelled steroids.
-The journal of endocrinology 1958, v17, 2, pp5.
- 41- HUDSON P.B., LOMBARDO M.E.,
Analysis of human adrenal v blood and adrenal glands
for steroidal substances.
-J.C.E.M. 1955, v15, 3, pp 324-31.

- 42- HYDE P.M., WILLIAMS R.H.,
Excretion of hydrocortisone $4C^{14}$. (abstract)
- J.C.E.M. 1954, v 14, 7, pp 817-n°110
- 43- ISSELEBACHER K.J., AXELROD J.,
Enzymatic formation of corticosteroids glucuronides.
- J.Am.Chem.Soc. 1955, v 77, pp 1078.
- 44- JAYLE M.F.,
Données nouvelles sur la glycuro et la sulfoconjugaison .
- Thérapie 1958, v 13, 2bis, pp 37-45.
- 45- KELLIE A.E., SMITH E.R.,
Renal clearance of 17-oxo-steroid conjugates found in human peripheral plasma.
- Bioch.J. 1957, v 66, 3, pp 490-95.
- 46- KLEIN R., PAPADATOS C., FORTUNATO J., BYERS C.,
Conjugated serum corticoids. (abstract)
- J.C.E.M. 1954, v 14, 7, pp 815-n°108.
- 47- LEVY G.A.,
The preparation and properties of -glucuronidase .
IV- Inhibition by sugar acids and their lactones.
- The Bioch.J. 1952, v 52, 3, pp 464-71.
- 48- MARKS L.J., LEAF A.,
The relationship of the renal excretion of adrenal corticoids to variations in renal hemodynamics.
- J.Clin.Inv. 1953, v 32, pp 813-17.
- 49- MIGEON Cl.J., SANDBERG A., DECKER H.A., SMITH D.F., PAUL A.C., SAMUELS L.T.,
Metabolism of $4C^{14}$ cortisol in man body distribution and rates of conjugation.
- J.C.E.M. 1956, v 16, 9, pp 1137-50.
- 50- MIGEON Cl.J., TYLER F.H., MAHONEY J.P., FLORENTIN A.A., CASTLE H., BLISS E.L., SAMUELS L.T.,
The diurnal variation of plasma levels and urinary excretion of 17-hydroxycorticosteroids in normal subjects.
- J.C.E.M. 1956, v 16, 5, pp 822-33.
- 51- MIGEON Cl.J., BERTRAND J., WALL P.E.
Physiological disposition of $4C^{14}$ cortisol during late pregnancy.
- J.Clin.Inv. 1957, v 36, pp 1350.

- 52- MORRIS C.J.O.R., WILLIAMS D.C.,
Estimation of individual adrenocortical hormones in
human peripheral blood.
- Ciba foundation "synthesis and metabolism of adrenocor-
tical steroids" 1953, v 7, pp 261-71.
- 53- NEHER R.,
Determination of individual adrenocortical steroids.
-" Advances in clinical chemistry".
- Acad.Press. New-York & London 1958, T 1, pp 127-192.
- 54- CERTEL G.W., EIK-NES K.B. ,
Dehydroepiandrosterone in blood. II- Isolation of complexes
from human blood plasma containing dehydroepiandrosterone
and phosphoric acid. Acta Endo. 1959, v30, pp 93-98.
- 55- PASQUALINI J.,
Mode de conjugaison de la corticosterone et de la 11-dehy-
drocorticosterone.
- CR.Ac.Sciences 1958, T 246, pp 2045-46.
- 56- PEARLMAN W.H. ,
Circulating steroid hormone levels in relation to steroid
hormone production.
- Ciba foundation "hormones in blood" 1957, v7, pp 33-51.
- 57- PETERSON R.E., WYNGAARDEN J.B.,
The miscible pool and turn over rate of hydrocortisone in
man.
- J.Clin.Inv. 1956 ,v 35, pp 552-61.
- 58- PETERSON R.E., WYNGAARDEN J.B., GUERRA S.L., BRODIE B.B., BUNIM J.J.,
The physiological disposition and metabolic fate of hydro-
cortisone in man.
- J.Clin.Inv. 1955, v 34, 12, pp 1779-94.
- 59- PETERSON R.E.,
Plasma corticosterone and hydrocortisone levels in man.
- J.C.E.M., 1957, v 17, 10, pp 1150-58.
- 60- PETERSON R.E., WYNGAARDEN J.B.,
The physiological disposition and metabolic fate of hydro-
cortisone in man.
- Ann.N.Y.Acad.Sc. 1955, v 61, pp 297-305.
- 61- PINCUS G., ROMANOFF E.B., ROMANOFF L.P.,
Current status of corticosteroid metabolism in man.
- Ciba foundation "Synthesis and metabolism of adrenocor-
tical steroids". 1953, v 7, pp 240-60.
- 62- PLAGER J.E., TYLER F.H., HECHT H.H., SAMUELS L.T.,
Metabolism and excretion of intravenously administered
4-C¹⁴-17-hydroxycorticosterone. (abstract).
- J.C.E.M. 1954, v 14, pp 780.

- 63- PLAGER J.E., SAMUELS L.T., BALLARD A., TYLER F.H., HECHT H.H.,
The rate of metabolism of cortisol in a normal human male.
- J.C.E.M. 1957, v 17, 1, pp 1 à 7.
- 64- ROBBINS J., RALL J.E.,
The interaction of thyroid hormones and proteins in biological fluids.
- Recent Progress Hormone Research. 1957, v 13, pp 161.
- 65- ROMANI J.D.,
Etude des corticoïdes totaux du sang .Identification des principales fractions C₂₁ et C₂₃-cétoïques.
- CR Soc.Biol. 1956, v 60, pp 1706-9.
- 66- ROMANOFF E.B., HUDSON P., PINCUS G.,
Isolation of hydrocortisone and corticosterone from human adrenal vein blood.
- J.C.E.M. 1953, v 13, 12, pp 1546-7.
- 67- ROMANOFF E.B., UNGAR F., DORFMAN R.I., PINCUS G.,
The perfusion of the isolated adrenal gland.(abstract)
- J.C.E.M. 1952, v 12, 7, 118, pp 968.
- 68- SAMUELS L.T.,
Studies of the enzymes involved in the synthesis and degradation of the hormones of the adrenal cortex.
- Ciba foundation "Synthesis and metabolism of adrenocortical steroids". 1953, v 7, pp 176-90.
- 69- SAMUELS L.T., BROWN H., EIK-NES K., TYLER F.H., DOMINGUEZ O.V.
Extra adrenal factors affecting the levels of 17-hydroxycorticosteroids in plasma.
- Ciba foundation "Hormones in blood" 1957, v11, pp208-32
- 70- SANDBERG A.A., SLAUNWHITE W.R.Jr, ANTONIADES H.N.,
The binding of steroids and steroid conjugates to human plasma proteins.
- Recent Progr.hormon.research 1957, v 13, pp 209-67.
- 71- SANDBERG A.A., SLAUNWHITE W.R.,
a) Differences in metabolism of prednisolone C and cortisol C .
- J.C.E.M. 1957, v 17, pp 1040.
b) (SANDBERG A.A., CHANG E., SLAUNWHITE W.R.Jr)
The conversion of 4-C¹⁴ cortisol to C¹⁴ - 17-ketosteroids.
- J.C.E.M. 1957, v 17, 3, pp 437-40.
- 72- SAVARD K., KOLFF W.J., CORCORAN A.C.,
Corticosteroids of peripheral blood.
- Endocrinology 1952, v 50, 3, pp 366-74.

- 73- SAVARD K.
Studies on the steroids o human peripheral blood.
- Ciba foundation "hormones in blood" 1957, v11, pp252-62.
- 74- SCHNEIDER J.J.,LEWBART M.L.,
Enzymatic synthesis of steroid sulfates.
- J.Biol.Chem. 1956, v 222, pp 787-94.
- 75- SLAUNWHITE W.R.,SANDBERG A.A.,
a) The metabolism of 1-dehydro-17-hydroxycorticosteroids
in human subjects.
- J.C.E.M. 1957, v 17, 3, pp 395-407.
b) Human metabolism of 1-dehydro-17-hydroxycorticosteroids.
- Fed.Proc. 1956, v 15, pp 357.
- 76- SLAUNWHITE W.R.,SANDBERG A.A.,
Transcortin : a cortico-steroid-binding protein of plasma.
- J.Clin.Inv. 1959, v 38, 2, pp 384-91.
- 77- SWEAT M.L.,ABBOTT W.E.,JEFFRIES W.M.,BLISS E.L.,
Adrenocortical steroids in human peripheral and adrenal
venous blood as determined by fluorescence.
- Fed.Proc. 1953, v 12, pp 141.
v 26, pp 773-6.
- 78- SWEAT M.L.,FARRELL G.L.,
Resolution and quantitative analysis of steroids in adrenal
vein blood. (abstract).
- J.C.E.M. 1952, v 12, 7,119, pp 968-69.
- 79- SWEAT M.L.,
Adrenocorticosteroids in peripheral and adrenal venous blood
of man.
- J.C.E.M. 1955, v 15, 9, pp 1043-57.
- 80- SZEGO C.M.,
Steroid interaction in the "in vitro" biosynthesis of ste-
roid-protein complexes.
- Ciba foundation "Hormones in blood" 1957, v11, pp 286-308
- 81- SZEGO C.M.,ROBERTS S.,
Hepatic intervention in the binding of estrogen to rat serum
albumin in vitro.
- J.Biol.Chem. 1956, v 221, pp 619.
- 82- SZEGO C.M.,
The loss of Estrogen -protein binding capacity in rathepa-
toma.
- Endocrinology 1955, v 57, 5, pp 541-49.
- 83- TYLER F.H.,MIGEON C.,FLORENTIN A.A.,SAMUELS L.T.,
The diurnal variation of 17-hydroxycorticosteroids levels
in plasma. (abstract)
- J.C.E.M., 1954, v 14,7,25, pp 774.

- 84- TOMKINS G., ISSELBACHER K.J.
Enzymatic reduction of cortisone.
- J. Am. Chem. Soc. 1954, v76, pp 3100.
- 85- UPTON G.V., BONDY P.K.,
The binding of cortisol by plasma protein.
- Arch. of Biochemistry and Biophysics 1958, v78, pp 197-205.
- 86- VERMEULEN A.
The metabolism of 4-Cl¹⁴ prednisolone. (abstract)
- The J. of Endo. 1958, v 17, 2, pp IV-V.
- 87- VERMEULEN A.,
Isolation of 1-4 pregnadiene-3-20-dione - 11 - 17 -
21-triol from the urine of patients treated with metacortandracin.
- J.C.E.M. 1956, v16, pp 163.
- 88- VERMEULEN A.
On the nature of conjugated adrenal corticoids in human peripheral blood.
- Acta Endo. 1956, v22, 2, pp 115-18.
- 89- VLIERS M., HEUGHEM C., VAN CAUWENBERGE H.,
Dosage des stéroïdes réducteurs dans le sang du rat normal.
- CR Soc. Biol. 1956, T 150, 10, pp 1825-27.
- 90- VLIERS M., HEUGHEM C., VAN CAUWENBERGE H.,
Etude du dosage des 17-hydroxycorticostéroïdes glucuronosulfoconjugués du plasma.
- Sem. Hôp. de Paris Arc. Soc. Franç. Biol. Méd. 1956, T 32, B 427 P B 1173.
- 91- VLIERS M., DEMEY L., HEUGHEM C., VAN CAUWENBERGE H.,
Etude des 17-hydroxycorticostéroïdes conjugués du plasma.
- CR Soc. Biol. 1955, T149, 23-24, pp 2271-3.
- 92- WALLACE E.Z., SILVERBERG H.I., CARTER A.C.,
Effect of ethinyl estradiol on plasma 17-hydroxycorticosteroids, ACTH responsiveness and hydrocortisone clearance in man.
- Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1957, v 95-4, pp 805-8.
- 93- WEICHSELBAUM T.E., MARGRAF H.W.,
Determination in plasma of free 17-hydroxy- and 17-desoxycorticosteroids and their glucuronic-acid conjugates.
- J.C.E.M. 1955, T15-8, pp 970-90.
- 94- WESTPHAL U.,
Steroid protein interaction. III-Spectrophotometric demonstration of interaction between proteins and progesterone, desoxycorticosterone and cortisol.
- Arc. Bioch. 1957, v66, pp 71.

- 95- WESTPHAL U., ASHLEY B.D.,
Spectrophotometric observations on interaction between proteins and 4-3 ketosteroids.
- Fed.Proc. 1957, v 16, pp 269.
- 96- WIEST W.G., FUJIMOTO G.I., SANDBERG A.A.,
Metabolism of progesterone 4-Cl¹⁴ in man.
- Fed.Proc. 1955, v 14, pp 304.
- 97- WYNGAARDEN J.B., PETERSON R.E., WOLFF A.R.,
Physiologic disposition of radiometabolites of hydrocortisone 4-Cl¹⁴ in the rat and guinea pig.
- J.Biol.Chem. 1955, v212, 2, pp 963-72.

CHAPITRE II

- 1 - ALLEN W.M.,
Simple method for analyzing complicated absorption curves of use in the colorimetric determination of urinary steroids.
- J.C.E.M. 1950, v 10, 1, pp 71-83.
- 2- BAYLISS R.I.S., STEINBECK A.W.,
a) A modified method for estimating 17-hydroxycorticosteroids in plasma.
- Memoirs of the society for Endocrinology 1953, v2, pp31-35
b) A modified method for estimating 17-hydroxycorticosteroids
- The biochemical J. 1953, v54, 3, pp 523-27.
- 3 - BORTH R.,
a) Le dosage chimique des corticostéroïdes urinaires.
- Chimia 1956, v10, 3, pp 49-58.
b) Le dosage chimique des corticostéroïdes urinaires.
- Chimia 1956, v10, 3, pp 81-90.
c) Problems related to the chemical assay of corticosteroids in human body fluids.
- Acta Endo. 1956, v22, fasc II, pp 125-35.
d) Steroids in human blood.
- Vitamins and hormones. Advances in research and applications. 1957, v 15, pp 259-90.
- 4 - BROOKS C.J.W., NORYMBERSKI J.K.,
The oxidation of corticosteroids with sodium bisnuthate.
Bioch. J. 1953, v55, pp 371-76.

- 5 - BUSH I.E.,
 - a) Cf I, 174)
 - b) Extraction and fractionation of steroid conjugates.
- Bioch.J. 1957, v67,4,29,
 - c) (BUSH I.E., SANDBERG A.A.)
Adrenocortical hormones in human plasma.
- J.Biol.Chem. 1953, v 205, 2, pp 783-95.
- 6 - CAUWENBERGE H. Van,
Réactivité corticosurrénalienne et dosage des corticostéroïdes sanguins chez le rat.
- CR.Soc.Biol. 1956, v 150, pp 1828-31.
- 7 - CERESA F., CRAVETTO C.A.,
A method for the simultaneous assay of 17-hydroxycorticosteroids and 17-ketosteroids both in their free and conjugated forms on the same plasma sample.
- Acta Endo. 1958, v29, 3, pp 321-33.
- 8 - CHAI C.,
Blood plasma concentration of reducing steroids in human plasma.
- J.Lab.Clin.Med. 1953, v 42, pp 795.
- 9 - CHEN C., WHEELER J., TEWELL H.E.,
Methods of estimation of adrenal cortical steroids with tetrazolium salts.
- J.Lab.Clin.Med. 1953, v42, pp 749-57.
- 10 - CHEN C., VOETGLI S.M., FREEMAN S.,
Estimation of total free reducing plasma steroids.
- The J. of Biol.Chem. 1955, v 217,2, pp 708-19.
- 11 - CORCORAN A.C., PAGE I.H.,
Methods for chemical determination of corticosteroids in urine and plasma.
- J.Lab.Clin.Med. 1948, v33, pp 1323-33.
- 12 - DE COURCY C., GRAY C.H.,
Studies on the determination of urinary corticosteroids.
- J.Endo. 1953, v9, pp 391-400.
- 13 - DORFMAN R.I.,
 - a) The bioassay of adrenocortical hormones.
- Recent Progress in hormon research; 1953, v8, pp87-116
 - b) Bioassay of steroid hormones.
- Physiological reviews 1954, v34, pp 138-166.
- 14 - DOYLE M.L., KATZMAN P.A., DOISY E.A.,
Production and properties of bacterial -glucuronidase.
- The J. of Biol.Chem. 1955, v 217, 2, pp 920-30.

- 15 - EDWARDS R.w.H., KELLIE A.E., WADE A.P.,
The extraction and oxidation of urinary steroids con-
jugates.
- The memoirs of the society of Endo. 1953, v2, pp53-63.
- 16 - EIK-NES K., NELSON D.H., SAMUELS L.T.,
Determination of 17-21- hydroxycorticosteroids in
plasma.
- J.C.E.M. 1953, v 13, 10, pp 1280-82.
- 17- EIK-NES K.,
Determination of 17-21-dihydroxy-20-ketosteroids in
blood plasma.
- J.C.E.M., 1957, v 17, 4, pp 502-11.
- 18 - ELY R.S., HUGHES E.R., KELLEY V.C.,
Studies of adrenal corticosteroids . I- Estimation of
plasma corticosterone and cortisol.
- J.C.E.M. 1958, v 18, 2, pp 190-207.
- 19 - GEIßZELL C.A.,
Methods of estimating corticosteroids in plasma.
- Scand.J.Clin. and Lab.Inv. 1955, v7, suppl. n° 16-20,
pp 105-113.
- 20- GOLD J.J.,
Blood corticoids : their measurement and significance:
a review .
- J.C.E.M. 1957, v17, 2, pp296-316.
- 21 - GORNALL A.G., MAC DONALD M.P.,
Quantitative determination of the steroid hormones
with 2-4-dinitrophenylhydrazine.
- J.Biol.Chem. 1953, v201, pp 279-97.
- 22 - HARWOOD T.C., MASON J.W.,
A systematic evaluation of the Nelson-Samuels plasma
17-hydroxycorticosteroids method.
- J.C.E.M., 1956, v 16, 6, pp 790-801.
- 23 - JARRIGE P., HENRY R.,
Etude de l'activité glucuronidasique du suc digestif
d'Helix pomatia (L) et de sa phénol-sulfatase.
- Bull.Soc.Chim.Biol. 1952, v34, 9, pp 872-85.
- 24 - KASSENBAAR A., MOLENAAR A., NIJLAND J., QUERIDO A.,
Estimation of 17-hydroxycorticosteroids in peripheral
human blood.
- J.C.E.M. 1954, v 14, pp 746.
- 25 - KASSENBAAR A., MOLENAAR A., NIJLAND J.,
Determination of 17-hydroxycorticoids in human periphe-
ral blood.
- Acta Endo. 1955, v18, fasc. 1, pp 60-7.

- 26 - KLEIN R., PAPADATOS C., FORTUNATO J., BYERS C.,
Acid hydrolyzable corticoids of serum.
- J.C.E.M. 1955, v 15, 2, pp 215-17.
- 27 - KLYNE W.
The chemistry of the steroids 1957.-methuen and Co
edit. London.
- 28 - LA BROSSE E.H.
Replacement of methanol with ethanol in the Porter-Silber reaction.
- Arc.Biol. 1954, v49, pp 451.
- 29 - LAMPE-HINTZEN D.A.V.M., HUIS IN'T VELD L.G.,
A typical Porter-Silber reaction after administration of sulfanerazine.
- J.C.E.M. 1955, v 15, 9, pp 1152-54.
- 30 - LEFTIN J.H., MARKS L.J., LEONARD M.P.,
The question of the destruction of 17-21-dihydroxycorticosteroids by phosgene.
- J.C.E.M. 1955, v 15, 3, pp 377-79.
- 31 - LEVY H., KUSHINSKY S.,
Methods of isolating corticosteroid from blood.
-Recent Progress Hormon research 1954, v9, pp 357-82.
- 32 - LIEBERMAN S., TEICH S.,
Recent trends in the biochemistry of the steroid-hormones.
- Pharn.Rev. 1953, v5, pp 285-380.
- 33 - LOMBARDO M.E., MANN P.H., VISCELLI T.A., HUDSON P.B.,
A method for the extraction of steroids from blood.
- J.Biol.Chem. 1955, v 212, 1, pp 345-51.
- 34 - LOMBARDO M.E., HUDSON P.B., MANN P.H., MITTELMAN A.,
A method for extraction of steroids from blood.
-Fed. Proceedings 1954, v13, 842, pp 254.
- 35 - LORAIN J.A.,
Corticosteroids ch. XI pp 244-86.
Clinical application of hormone assay.
Levingstone 1958.
- 36 - MADER W.J., BUCK R.R.,
a) Colorimetric determination of cortisone and related Ketol steroids.
- Analyt. Chem. 1952, v 24, pp 666-67.
b) Colorimetric determination of cortisone and related Ketol steroids.
- Analyt. Chem. 1951, v 21, pp 1748.

- 37 - MARKS L.J., LEFTIN J.H.,
A note of caution on the lack of specificity of the
Porter-Silber reaction for 17- α -dihydroxy- Δ^4 -steroids.
- J.C.E.M. 1954, v 14, pp 1263-65.
- 38 - MASON H.L.,
a) Hydrolysis of conjugates and extraction of urinary
corticosteroids.
- Recent prog. in Horm. Research 1954, v9, pp 267-301.
b) Methods for assessment of adrenocortical function.
- J.C.E.M. 1955, v 15, 8, pp 1035-38.
- 39 - MIGEON Cl.J., SANDBERG A.A., BLISS E.L., KELLER A.R.,
Non-conjugated adreno-cortical steroids in human plasma.
comparison of the Nelson and Samuels ^{method} with paper chromato-
graphic techniques.
- J.C.E.M. 1956, v 16, 2, pp 253-61.
- 40 - MORRIS C.J.O.R., WILLIAMS D.C.,
a) The polarographic estimation of steroid hormones.
VI- Determination of individual adrenocortical hormones
in human peripheral blood.
- Bioch.J. 1953, v 54, pp 470-75.
b) Gradient elution chromatography of corticosteroids in
human blood.
- Ciba foundation colloquia on Endo 1955, v8, pp 157-64.
c) (in KLYNE W., WOLSTEN G.E.W., et CAMERON M.P.)
Estimation of individual adrenocortical hormones in human
peripheral blood.
- Ciba foundation colloquia on Endo. London 1953, v7,
pp 261-71.
- 41 - MULLER A.F., GRABBE J., RIONDEL A., SANZ M.C.,
Dosage des 17-hydroxycorticostéroïdes plasmatiques. Etude
comparative de 2 méthodes. Communication préliminaire.
- Schweiz Med. Wochschr. 1955, v 85, 40, pp 968-9.
- 42 - NEHER R. - of I - 53.
- 43 - NELSON D.H., SAMUELS L.T.,
A method for the determination of 17-hydroxycorticosteroids
in blood : 17-hydroxycorticosterone in the peripheral
circulation.
- J.C.E.M. 1952, v 12, 5, pp 519-26.
- 44 - NOWACZYNSKY W., GOLDNER M., GENEST J.,
Microdetermination of corticoids with tetrazolium deriva-
tives.
- The J. of Lab. and Clin. Med. 1955, v 45, 5, pp 818-21.
- 45 - O'SULLIVAN D.G.,
An extension of the Allen colour-correction process and its
application to determinations on steroid fractions.
- Acta Endo. 1958, v 28, Fasc IV, pp 459-66.

- 46 - PETERSON R.E.,
The identification of corticosterone in human plasma and
its assay by isotope dilution.
- J.Biol.Chem. 1957, v 225 pp 25-38.
- 47 - PETERSON R.E.,
Plasma corticosterone and hydrocortisone levels in man.
- J.C.E.M. 1957, v 17, 10, pp 1150-7.
- 48 - PETERSON R.E., KARRER A., GUERRA S.L.,
Evaluation of the Silber-Porter procedure for the deter-
mination of plasma-hydrocortisone .
- Analytical chemistry 1957, v 29, 1, pp 144-9.
- 49 - PORTER C.C., SILBER R.H.,
A quantitative color reaction for cortisone and related
17- α dihydroxy- 20-ketosteroids.
- J.Biol.Chem. 1950, v 185, pp 201-7.
- 50 - RECKNAGEL R.O., LITTERIA M.,
A simplified Blue Tetrazolium reaction.
- J.Lab.Clin.Med. 1956, v 48, 3, pp 463-68.
- 51 - REDDY W.J.,
Modifications of the Reddy-Jenkins-Thorn method for the
estimation of 17-hydroxycorticosteroids in urine metabolism
1954, v3, pp 489-92 .
- 52 - REDDY W.J., HAYDAR N.A., LAIDLAW J.C., RENOLD A.E., THORN G.W.
Determination of total 17-hydroxycorticosteroids in plasma
- J.C.E.M. 1956, v 16, 3, pp 380-90.
- 53 - ROBERTS S., SZEGO C.M.,
Biochemistry of steroid hormones.
- Ann. Review Biochemistry 1955, v24, pp 543-96.
- 54 - ROSENBERG E., CORNFELD J., BATES R.W., ANDERSON E.,
Bioassay of adrenal steroids in blood and urine based on
Eosinophil response : a statistical analysis.
- Endocrinology 1954, v 54, 4, pp 363-83.
- 55 - SALVESEN S., NISSEN-MEYER R.,
Influence of meprobanate therapy on the estimation of
17-ketosteroids and 17-ketogenic steroids.
- J.C.E.M. 1957, v 17, 7, pp 914-15'
- 56 - SAMUELS L.T.,
The metabolism of the steroid hormones.
-"Progress Chem. -Fats and other lipids." 1955, v3, pp 395.
- 57 - SANDBERG A.A., NELSON D.H., GLENN E.A., TYLER F.F., SAMUELS L.T.,
17-hydroxycorticosteroids and 17-K.S. in urine of human sub-
jects by method employing β -glucuronidase hydrolysis.
- J.C.E.M. 1953, v 13, 12, pp 1445-65.

- 58 - SILBER R.H., PORTER C.C.,
a) The determination of 17-21 -dihydroxy-20-ketosteroids in urine and plasma.
- J.Biol.Chem. 1954, v 210, pp 923-32.
b) Determination of 17-21 - dihydroxy -20 -ketosteroids in urine and plasma.
- Methods of Biochemical analysis 1957, v4, pp 139-69.
- 59 - SILBER R.H., BUSCH R.D.,
a) The specificity of the reaction of phenylhydrazine with 17-21 -dihydroxy- 20-ketosteroids
- J.C.E.M. 1955, v 15, 4, pp 505-7.
b) An improved procedure for the determination of hydrocortisone in human plasma.
- J.C.E.M. 1956, v 16, 10, pp 1333-36.
- 60 - SULMAN F.G.,
Semi micronethod for routine determination of urinary 17-hydroxycorticoids.
- Acta Endo . 1956, v 22, fasc2, pp 107-14.
- 61 - SWEAT M.L., ABBOTT W.F., JEFFRIES W.M., BLISS E.L.,
Adrenocortical steroids in human peripheral and adrenal venous blood as determined by fluorescence.
- Fed.Proc. 1953, v26 ,pp 773-6.
- 62 - SZEGO C.M.
In HIGDON C.J., PLAGER J.E. : Neutral 17-ketosteroids in human plasma.
- Recent Prog. in Hormones Research 1954, v9, pp 235-50.
- 63 - TAMM J., BECKMANN I., VOIGT K.D.,
Über Blutsteroiden II Papierchromatographische Untersuchungen am peripheren menschlichen Blutplasma.
- Acta Endo. 1958, v27, Fasc 4, pp 403-15.
- 64 - TAMM J., BECKMANN I., VOIGT K.D.,
a) Determination of neutral steroids in human blood.
- 2nd Acta Endo. Congress Oslo 1956, Août-suppl. 1957, v31, pp 219-25.
b) Über Neutralsteroiden im Blut. I- Probleme der Extraktion Hydrolyse und Reinigung der Extrakte.
- Acta Endo. 1958, v 27, pp 292.
- 65 - VAN der VIES J.,
The determination of free 17-21- dihydroxy- 20-ketosteroids in small amounts of 4 ml of peripheral blood.
- Acta Endo. 1959, v 30, fasc IV, pp 523-29.
- 66 - VERMEULEN A., DEMEULENAERE L.,
Le rôle du foie dans le métabolisme des corticoïdes.
- Revue Fr. Etudes Clin. et Biol. 1956, v1, 4, pp 398-405

- 67 - VIVARIO R., VAN CAUWENBERGE H., VLIERS M., HEUSGHEM C.,
Technique de dosage des 17-hydroxycorticostéroïdes dans
le sang et dans les urines .
- Ann. d'Endo. 1954, T 15, 3, pp 365-71.
- 68 - VLIERS M., HEUSGHEM C., VAN CAUWENBERGE H.,
a) Etude du dosage des 17-hydroxycorticostéroïdes glu-
curo- et sulfoconjugués du plasma.
- Sem.Hôp.Paris Arc.Soc.Franc.Biol.Med. 1956, 32 B,
427 P et B 1173.
b) Dosage des stéroïdes réducteurs dans le sang du rat
normal.
- CR Soc. Biol. 1956, T 150, pp 1825-27.
- 69 - WEICHSELBAUM T.E., MARGRAF H.W.,
a) Determination in plasma of free 17-hydroxy and 17-de-
soxycorticosteroids and their glucuronic acid conjugates
- J.C.E.M. 1955, v 15, 8, pp 970-90.
b) Determination of 4-3 ketocorticosteroid in human
peripheral plasma by isonicotinic acid hydrazide (INH)
reaction.
- J.C.E.M. 1957, v 17, 8, pp 959-66.
- 70 - WESTPHAL U.,
Interaction between hydrocortisone 4- C^{14} or progestérone-
4- C^{14} and serum-albumin as demonstrated by ultracentri-
fugation and electrophoresis.
- Endocrinology 1955, T 57, 4, pp 456-65.

o

o

o

- I- ASSALI N.S., GARST J.B., VOSKIAN J.
Blood levels of 17-hydroxycorticosteroids in normal and toxemic pregnancies.
- The Journal of laboratory and clinical medicine 1955 , v 46 n°3 pp. 385-91 .
- 2- ASSALI N.S., HAMERMESZ J.
Adrenocorticotropic substances from human placenta.
- Endocrinology 1954 , v 55, 5, pp 561-68 .
- 3- BAYLISS RIS., STEINBECK A.W.,
 - a) The adrenal response to corticotrophin. Effect of A.C.T.H. on plasma adrenal steroid levels.
- British. Med. journal 1954, vl, pp486-90.
 - b) Salicylates and the plasma levels of adrenal steroids.
-LANCET , 1954, May I , pp 1010- 11 .
- 4- BAYLISS RIS., BROADBENT I.E., STEINBECK A.W.,
Congenital adrenal hyperplasia .Effects of corticotrophin and tetrahydrocortisone.
- LANCET 1954, v 1 , pp 434.
- 5- BAULIEU E.E.,
 - a) Les hypercorticismes surrénaliens .
- 1957 , Masson edit.
 - b) Méthodes de diagnostic des virilismes d'origine cortico-surrénalienne.
-Problèmes actuels d'endo. et de nutrition, 2è série 1958.
- 6- BAULIEU E.E., de VIGAN M., BRICAIRE H., JAYLE M.F.,
Lack of plasma Cortisol and urinary aldosterone in a pregnant woman with Addison disease.
J.C.E.M., 1957 , v 17 , 12 , pp 1478-81.
- 7- BERTRAND J.,

Pédiatrie, 1957, v 12 , 5, pp 475-502.
- 8- BLISS E.L., MIGEON C.J.,
Endocrinology of anorexia nervosa.
J.C.E.M., 1957, v 17, 6, pp 766-76.
- 9- BLISS E.L., NELSON D.H., SAMUELS L.T.,
The effect of intravenous A.C.T.H.,
- J.C.E.M., 1954, 14, pp 423.
- 10- BONGIOVANNI A.M., EBERLEIN W.R., CARA J.,
Studies on the metabolism of adrenal steroids in the adrenogenital syndrome.
- J.C.E.M. 1954, v 14, pp 409.

- 11- BROWN H., ENGLERT E. Jr., WALLACH S., SIMONS E.L.,
Metabolism of free and conjugated 17-hydroxycorticosteroids in normal subjects.
- J.C.E.M., 1957, v 17, 10, pp 1191-1201.
- 12- BROWN H., SAMUELS L.T.,
Corticosteroid metabolism in liver disease. (Abstract)
- J.Clin. Inv. 1954, v 33, pp 919-20.
- 13- BROWN H., ENGLERT E., WALLACH S.,
Metabolism of free and conjugated 17-hydroxycorticosteroids in subjects with thyroid disease.
- J.C.E.M. 1958, v 18, 2, pp 167-77.
- 14- BROWN H., WILLARDSON D.G., SAMUELS L.T., TYLER F.H.,
17-hydroxycorticosteroid metabolism in liver disease.
- J.Clin. Inv. 1954, v 33, 11, pp 1524-32.
- 15- BUTT H.R., ARIAS I.M., BOLLMAN J.L., ISSELBACHER K., SCHMID R.,
Panel : Bilirubin metabolism.
Gastro-enterology, 1959, v 36, 2, pp 161-170.
- 16- CASPI E.Y., LEVY H., HECHTER O.M.,
Cortisone metabolism in liver. II- Isolation of certain cortisone metabolites.
- Arc. Bioch. and Bioph. 1955, v 45, 1, pp 15-32.
- 17- CHRISTY N.P., WALLACE E., GORDON J.W., JAYLER J.W..
a) On the rate of hydrocortisone clearance from plasma in pregnant women and in patients with Laennec's cirrhosis.
- J.Clin. Inv. 1959, v 38, 2, pp 299-305.
b) The effect of intravenously administered A.C.T.H. on plasma 17-³¹P-dihydroxy-²⁰O-ketosteroids in normal individuals and in patients with disorders of the adrenal cortex.
- J.Clin. Inv. 1955, pp 899-906.
- 18- COHEN M., STAEFEL M., REDDY M.J., LAIDLAW J.C.,
The secretion and disposition of cortisol during pregnancy.
- J.C.E.M., 1958, v 18, 10, pp 1076-83.
- 19- DESGREZ P., HAAS J., WEINMANN S.H.,
Le dosage des corticoïdes formaldehydogènes par la méthode de diffusion et ses applications physio-pathologiques.
- Ann. Biol. Clin. 1957, n 5/6 pp 289-305.
- 20- DOBNER K.,
Studies in steroid metabolism XXII. The adrenal response to A.C.T.H. in young and old men.
- J. Clin. Inv. 1954, v 33, 2, pp 422-9

- 21- ORDEN AW R.J.,
In vivo metabolism of neutral steroid hormones.
- J.C.E.M. 1954, v 14, pp 313-325.
- 22- EIK-NES K., SANDBERG A.A., NELSON D.H., TYLER F.H., SAMUELS I.T.
Changes in plasma levels of 17-hydroxycorticosteroids during the intravenous administration of A.C.T.H.
1- A test for adrenocortical capacity in the human.
J. Clin. Inv. 1954, v 33, 11, pp 1502-08.
- 23- EIK-NES K., SANDBERG A.A., TYLER F.H., SAMUELS I.T.
Plasma levels of 17-hydroxycorticosteroids following the administration of adrenal steroids.
Acta Endo. 1955, 18, 244.
- 24- EIK-NES, SANDBERG A.A., TYLER F.H., SAMUELS I.T.,
Changes in plasma levels of 17 hydroxycorticosteroids induced by A.C.T.H.III: Effects of various vehicles and modes of administration.
J.C.E.M., 1958, v 18, 8 pp 782-5
- 25- EIK-NES K., CLARK L.,
Diurnal variation of plasma 17-hydroxycorticosteroids in subjects suffering from severe brain damage.
J.C.E.M. 1958, v 18, 7, pp 764-6 .
- 26- ELY R.S., RAILE R.B., BRAY P.F., KELLEY V.C.,
Studies of 17-hydroxycorticosteroids. IV- Evaluation of a standard A.C.T.H.- 17-hydroxycorticosteroid response test in children.
- Pediatrics 1954, v 43, pp 403.
- 27- ELY R.S., KELLEY V.C., RAILE R.B.,
Studies of 17-hydroxycorticosteroids in children.
I- Peripheral blood levels in health and disease.
- J. Pediat. 1952, v 42 pp 38 .
- 28- ENGLERT E., BROWN H., WILLARDSON DG., WALLACH S., SIMONS E.L.,
Metabolism of free and conjugated 17-hydroxycorticosteroids in subjects with uremia.
- J.C.E.M., 1958, v 18, 2, pp 36-49.
- 29- ENGLERT E., BROWN H., WALLACH S., SIMONS E.L.,
Metabolism of free and conjugated 17-hydroxycorticosteroids in subjects with liver disease.
J.C.E.M., 1957 , v 17, 12, pp 1395- 1406.
- 30- ENGLERT E. Jr., NELSON R.M., BROWN H., NIELSEN T.W., CHOU S.N.,
Effects of changing hepatic blood flow on 17-hydroxycorticosteroids metabolism.
- Surgical forum of 42nd. Ann. clin. Congress Am. College of surgeons - San Francisco 1956

- 31- EULER U.S.v., GEMZELL C.A., LEVI L., STROM G.,
Cortical and medullary adrenal activity in emotionnal
stress.
Acta Endo. 1959, v 30 fasc.IV, pp 567-73.
- 32- FRANKSSON C., GEMZELL C.A.,
Adrenocortical activity in the preoperative period.
- J.C.E.M., 1955, v 15, 9, pp 1069,72.
- 33- FRANKSSON C., GEMZELL C.A., VON EULER U.S.,
Cortical and medullary adrenal activity in surgical
and allied conditions.
- J.C.E.M., 1954, v 14, 6, pp 608-22.
- 34- GELLER M.D., GABRILOVE J.L., SOFFER L.J.,
Response of plasma 17-21-dihydroxy-20-ketosteroids
to repository corticotrophin.
J.C.E.M., 1957, v 17, 3, pp 390-94.
- 35- GEMZELL C.A.,
Blood levels of 17-hydroxycorticosteroids in normal
pregnancy.
- J.Clin.End.Met. 1953, v13,8, pp 898-902.
- 36- GEMZELL C.A., FRANKSSON C.,
The effect of A.C.T.H. on the blood level of 17-hydro-
xycorticosteroids and the circulating eosinophils
in man.
Acta Endo. 1953, v14 fasc. III-pp205-213.
- 37- GILBERT DREYFUS, SIGUIER F., ZARA M., DUCHANGE J.,
Coma addisonien avec collapsus total déclenché par un
test de Thorn. Guérison obtenue par adjonction de
nor-adrenaline à la cortisone.
- Bulletin mem. Soc. med. Hop.Paris 1955, v71, pp 159
- 38- GORDON D., HORWITT B.N., SEGALOFF A.,
Adrenal response to A.C.T.H. in various clinical
conditions.
- J.C.E.M. 1954, v 14, 3, pp 297-309.
- 39- HELMRICH M.L., JENKINS D., SHAN H.,
The adrenal cortical response to surgery. II- Changes
in plasma and urinary corticosteroid levels in man.
Surgery 1957, v 41,6, pp 895-908.
- 40- HEUSGHEM C., VAN CAU'ENBERGE,
Que peut-on attendre du dosage des corticostéroïdes
sanguins et urinaires en clinique médicale?
- Acta clinica belgica 1956, v11, 5, pp 431-41.
- 

- 41- HUME D.M., NELSON D.F., MILLER D.V.,
 - a) Blood and urinary 17-hydroxycorticosteroids in patients with severe burns.
-Annals of surgery 1956, v 143, 3, pp 316-29.
 - b) Adrenal cortical function in surgical shock.
Surgical forum: clinical congress of the american college of surgeons: (1954)- Sanders and Co edit.
1955, vol.V, pp 568-575.
- 42- JAYLE M.F.,
Elimination des stéroïdes urinaires au cours des grossesses normales et pathologiques.
- S.F.P., 1953, T.29, 36. pp 1790-95.
- 43- JENKINS D., FORSHAM PH., LAIDLAW J.C., REDDY W.J., THORN G.W.,
Use of ACTH in the diagnosis of adrenal cortical insufficiency.
- Am.J.Med. 1955, v 13, pp 314.
- 44- JONES K.A., LLOYD JONES R., RICHDEL A., TAIT J.F., TAIT S.E.S.,
BULBROOK R.D., GREENWOOD F.C.,
Aldostérone secretion and metabolism in normal men and women and its pregnancy.
-Acta Endo. 1959, v 30 Fasc 3, pp 321-342.
- 45- KASS E.F., HECHTER O., MACCHI I.A., MOU T.W.
Alterations in the nature of the adrenal secretion induced by the prolonged administration of ACTH to rabbits (abstract).
- J. Clin. Inv. 1954, v 33, pp 947.
- 46- KASANEN A., PERKARINEN A., THOMASSON B.,
On the 17-hydroxycorticosteroid content in the plasma and its daily rhythm in renal insufficiency.
II- the conjugated 17-hydroxycorticosteroids.
- Acta Endo 1959, v 30, 3, pp 353-68 .
- 47- KELLEY V.C., ELY R.S., FAILE R.B.,
Metabolic studies in patients with congenital adrenal hyperplasia. Effects of cortisone therapy .
- J.C.E.M., 1952, v 12, 9, pp 1140-62.
- 48- KLEIN R., FORTUNATO J., PAPADATOS C.,
Free blood corticoids in the newborn infant.
- J. Clin. Inv. 1954, v 33, 1 , pp 35-8.
- 49- KLEIN R., PAPADATOS C., FORTUNATO J., BYERS C., PUNTERERI A.,
Serum corticoids in liver diseases.
- J.C.E.M., 1955, v 15, 8, pp 943-953.
- 50- LAIDLAW J.C., JENKINS D., REDDY W.J., JAKOBSON T.,
The diurnal variation in adrenocortical secretion.
(abstract)-J.Clin. Inv. 1954, v 33, pp 950.

- 51- LAIDLAW J.C., JENKINS D., REDDY W.J., HARRISON J.H., THORN G.M.
Diagnosis of hyperadrenocorticism. (abstract)
- J.C.E.M. 1954, v 14, pp 781.
- 52- MAENGWYN-DAVIES G.D., WEINER R.,
Excretion of 17-hydroxycorticosteroids during the
menstrual cycle.
- J.C.E.M., 1955, v15, 9, pp 1150-52.
- 53- MIGEON C.J., BERTRAND J., WALL P.E., STEMPFEL R.S., PRYSTOWSKY H.,
Metabolism and placental transmission of cortisol during
pregnancy near term.
- Ciba foundation - "Hormones in blood" 1957, v11, pp 66-61
- 54- MOORE FD., STEENBURG RW., BALL MR., WILSON GM., MYRDEN J.A.,
Studies in surgical Endocrinology. I- The urinary excre-
tion of 17-hydroxycorticosteroids and associated meta-
bolic changes, in cases of soft tissue trauma of varying
severity and in bone trauma.
- Surgery 1955, v141, 2, pp 145-184.
- 55- ORABONA M.L., FISCHER G., ROMANI JD.,
Etude de l'élimination urinaire des corticoïdes α -cétol-
iques chez les sujets atteints d'affections hépatiques.
Evaluation après hydrolyse enzymatique des urines.
- CR.Soc.Biologie 1956, Tome CL, 10, pp 1710-12
- 56- PEKKARINEN A., KASANEN A., KALLIO V., TALA E.,
On the 17-hydroxycorticosteroid content in plasma and
its daily rhythm in renal insufficiency.
I- The free 17-hydroxycorticosteroids.
- Acta Endo. 1959, v30, 3, pp 343-352.
- 57- PERKOFF GT., SANDBERG A.A., NELSON D.H., TYLER F.H.,
Clinical usefulness of determination of circulating
17-hydroxycorticosteroid levels .
- Arch.int. med. 1954, v93, pp 1-6.
- 58- PERKOFF GT., EIK-NES K., YUGENT CA., FRED M.L., NIM DR RA., RUSH L.,
SAMUELS LT., TYLER FH.,
Studies of the diurnal variation of plasma 17-hydroxy-
corticosteroids in man.
- J.C.E.M. 1959, v 19, 4, pp 432-44.
- 59- PERSKY F.,
Adrenocortical function in anxious human subjects : the
disappearance of hydrocortisone from plasma and its me-
tabolic fate.
- J.C.E.M. 1957, v 17, 6, pp 760-66
- 60- PETERSON R.E., SCHMID R.,
A clinical syndrome associated with a defect in steroid
glucuronide formation. - J.C.E.M. 1957, v17, 12, pp 1485-8.

- 61- ROBBINS E.D., BURTON S.D., BYERS S.O., FRIEDMAN M., GEORGE S.S.,
ISHIDA T.,
Hydrocortisone metabolism in the perfused isolated Rat
liver.
- J.C.E.M. 1957, v17, 1, pp 111-15.
- 62- SAMUELS LT., BROWN F., EIV-YES K., TYLER F.H., DOMINGUEZ O.V.,
Extra adrenal factors affecting the levels of 17-hy-
droxycorticosteroids in plasma.
- Ciba foundation "Hormones in blood" 1957, vXI, pp 08-32
- 63- SANDBERG AA., SLAUNWHITE JR.,
Metabolism of Cortisol $4C^{14}$ in subjects with Addison's
disease.
- J.C.E.M. 1958, v18, 6, pp 662-65 .
- 64- SANDBERG AA., EIV-YES K., SAMUELS L.T., TYLER FH.,
The effect of surgery on the blood levels and metabo-
lism of 17-hydroxycorticosteroids in man.
J.Clin.Inv. 1954 ,v 33, pp 1509-16.
- 65- SANDBERG A.A., NELSON DH., PALMER J.G., SAMUELS LT., TYLER FH.,
The effects of epinephrine on the metabolism of 17-hy-
droxycorticosteroids in the human.
- J.C.E.M. 1953, v13, 6, pp 629- 46.
- 66- SCHWARTZ J.,
L'exploration fonctionnelle de la corticosurrénale.
- 1 vol. Masson edit. 1953.
- 67- SLAUNWHITE JR. Jr., SANDBERG AA.,
The binding of urinary conjugated steroids to serum
albumin : a new method of extraction.
Endocrinology 1958, v 62, 3, pp 283-87.
- 68- SIKER ES.,
The effect of preanesthetic medications on the blood
level of 17-hydroxycorticosteroid.
- Am. Surg. 1956, v 143, 88.
- 69- STEENBERG RW.,
A study of the free 17-hydroxycorticosteroid in the
peripheral blood of surgical patients.
-Surgical forum, Philadelphia, W.B. Saunders Company
1954, v 5 pp 593.
- 70- STEENBERG RW., LENNIHAN R., MOORE F.,
Studies in surgical Endocrinology. II-The free blood
17-OH in surgical patients; their relation to urine
steroids, metabolism, and convalescence.
- Ann. Surg. 1956, v 143, 2, pp 180-209.

- 71- SOFFER L.J., GELLER J., GABRILOVE J.L.,
Response of the plasma 17-hydroxycorticosteroid level
to gel ACTH, in tumorous and non tumorous Cushing's
syndrome .
- J.C.E.M. 1957, v 17, 7, pp 878-83.
- 72- SZEGO C.M., ROBERTS S.,
Steroid action and interaction in uterine metabolism .
- Recent Progress in hormon Research 1953, v8, pp419-69.
- 73- TAMM J., BUSCH D., VOIGT E.D.,
Über Blutsteroid e des Einfluss von intravenösen ACTH.
gaben auf den Blutspiegel und die Ausscheidung von
freien und Geburde von neutralen Steroiden.
- Acta Endo 1958, v 28, fasc 4, pp 435-47 .
- 74- THORN C.W.,
Measurement of adrenal cortical function.(editorial)
- J.C.E.M. 1953, v 13, 5, pp 613-16.
- 75- THORN C.W., and others,
Pharmacologic aspects of adrenocortical steroids and
ACTH.in man.
-New Engl. J.of Med. 1953, n°248, pp 232-45, 84-94;
323-337, 69-78; 414-23, 588-601, 32-46;
- 76- TOBIAN L. Jr.
Cortical steroid excretion in Edema of pregnancy,
pre-eclampsia and essential hypertension.
- J. Clin. Endo. 1949, v9, pp 319.
- 77- TYLER F.H., SCHMIDT C.D., EIK-NES K., BROWN H., SAMUELS L.T.,
The role of the liver and the adrenal in producing
elevated plasma 17-hydroxycorticosteroid levels in
surgery.
- J. Clin. Inv. 1954, v33 ,11, pp 1517-23.
- 78- TYLER F.H., SANDBERG AA., EIK-NES K.,
Adrenal-cortical reserve and its relation to stress.
(abstract) -J. Clin. Inv. 1953, v 32, pp 608.
- 79- VENNING E.H.,
Adrenal function in pregnancy .
-Endocrinology 1946, v39,3, pp 203-20.
- 80- VIRTUE R.W., HELMREICH M.L., GAINZA E.,
The adrenal cortical response to surgery. I-The effect
of anesthesia on plasma 17-hydroxycorticosteroid levels
- Surgery 1957, v 41, 6, pp 549-66 .
- 81- WALLACE E.Z., CHRISTY N.P., TADLER J.N.,
Clinical application of the simplified Silber-Porter
method for determining plasma 17-hydroxycorticosteroids
-J.C.E.M. 1955, v 15, 9, pp 1073-88 .

- 82- WEICHSELBAUM T.E., MARGRAF H.W., ELMAN R.,
Quantitative determination of 17-hydroxycorticosteroids in the peripheral blood of humans before and after operative trauma.
- Fed. Proc. 1953, v12, 948, pp 287.
- 83- WEICHSELBAUM T.E., ELMAN R., MARGRAF H.W.
Study of potentially active adrenocortical steroids in peripheral human plasma after various stresses.
- J.C.E.M. 1957, v17, 10, pp 1158-67.
- 85- WILSON H., LOVELACE J.R., HARDY J.D.,
The adrenocortical response to extensive burns in man.
- Surgery 1955, v141, 2, pp 175-84.
- 84- WILLIAMS G.A., CRISPELL K.R., PARSON W.,
Adrenocortical function in Myxedema.
- J.C.E.M. 1957, v17, 11, pp 1347-59.

o
o o

CHAPITRE V

- 1 - ALFSEN A.,
Purification de la β -glycuronidase d'"helix pomatia"
et étude de la cinétique d'hydrolyse de quelques
substrats.
- Thèse Fac. Sciences Paris 1958, dactylographiée 142p.

o
o o

